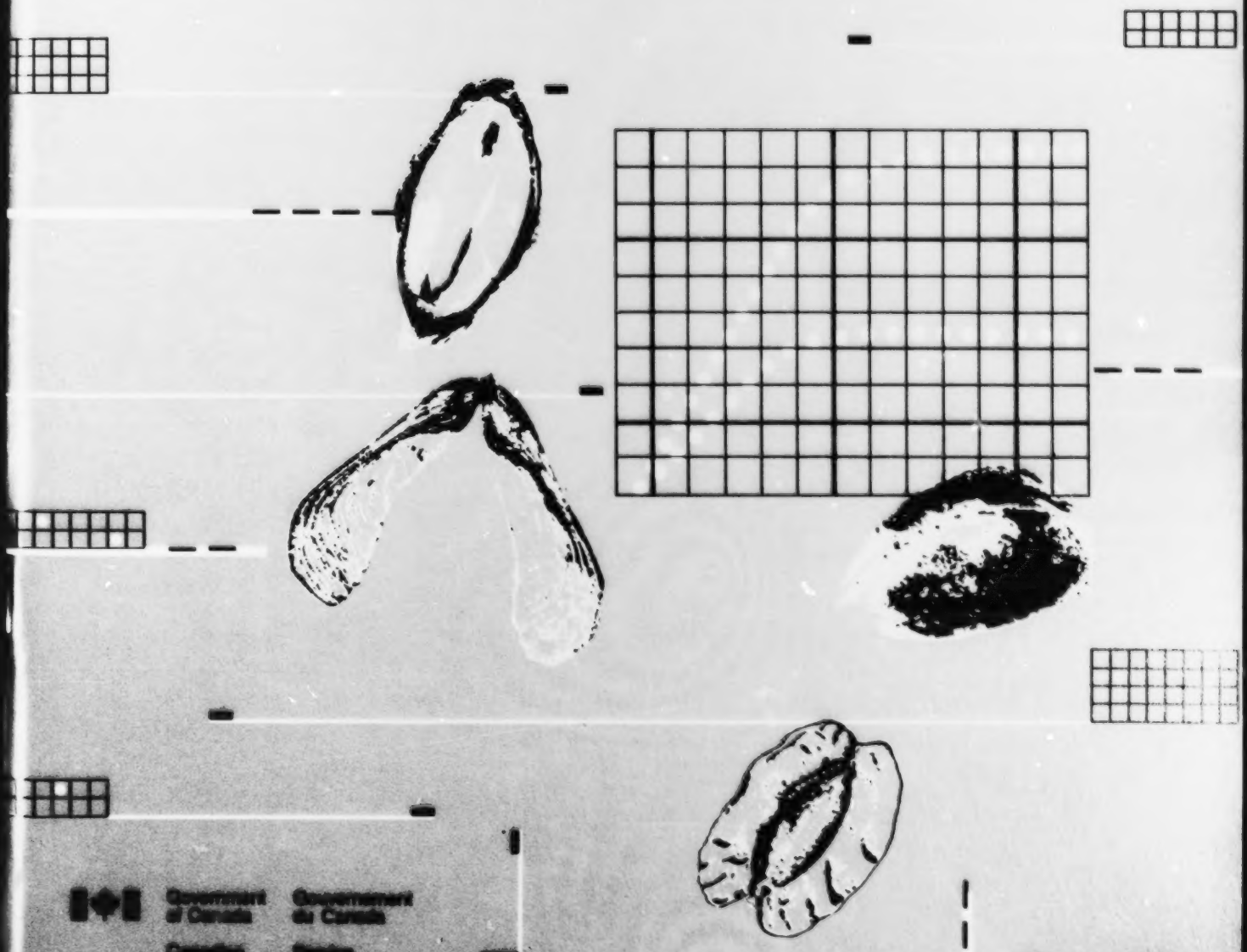
Methods and procedures for

TESTING · TREE · SEEDS

in Canada

D.G.W. Edwards

Forestry
Technical
Report 36



Government of Canada
Canadian Forestry Service

Gouvernement du Canada
Service canadien des forêts

Canada

89-02926/

Methods and

procedures for

TESTING · TREE · SEEDS

in Canada

D.G.W. Edwards

Canadian Forestry Service
Pacific Forestry Centre
506 West Burnside Road
Victoria, B.C.
V8Z 1M5

Forestry
Technical
Report 36

Canadian Forestry Service
Government of Canada
Ottawa
1987

©Minister of Supply and Services Canada
1987
Cat. No. Fo64-36/1987
ISBN 0-662-55446-9

Copies of this publication may be
obtained free of charge from:

Canadian Forestry Service
Place Vincent-Massey, 3rd Floor,
Ottawa, Ontario
K1A 1G5

or:

Pacific Forestry Centre
506 West Burnside Road
Victoria, British Columbia
V8Z 1M5

A microfiche edition of this publication
may be purchased from:

Micromedia Ltd.
158 Pearl Street
Toronto, Ontario
M5H 1L3

Table of Contents

Abstract 5

Preface 6

1. Introduction 7

1.1 Objective of seed testing 7

1.2 Responsibility of seed analysts 7

1.3 Need for uniform testing methods 8

2. Sampling 8

2.1 General outline 8

2.2 General principles 8

2.3 Definitions 8

2.4 The seed lot 8

2.5 Procedure for sampling a seed lot 8

2.5.1 General directions 8

2.5.2 Apparatus and sampling method 9

2.5.3 Sampling intensity 10

2.5.4 Obtaining the samples 11

2.5.5 Weight of the submitted sample 11

2.6 Transporting the sample to the laboratory 11

2.7 Storage of samples 11

2.7.1 Before testing 11

2.7.2 After testing 11

2.8 Laboratory sampling 12

2.9 Marking and sealing the lot 12

2.9.1 General directions 12

2.9.2 Procedure for marking and sealing 12

3. Purity analysis 13

3.1 Object 13

3.2 Definitions 13

3.3 Wings and integuments 13

3.4 Testing procedure 13

3.4.1 Obtaining the working sample 13

3.4.2 Sampling procedure in the laboratory 13

3.4.3 Purity separation 14

3.4.4 Weighing, calculation, and expression of results 14

4. Weight determination 16

4.1 Object 16

4.2 Procedure 16

4.2.1 Counting replications 16

4.2.2 Calculation and expression of results 16

5. Germination test 17

5.1 Object 17

5.2 Definitions 17

5.3 General principles 19

5.4 Materials 19

5.4.1 Paper 19

5.4.2 Sand 20

5.4.3 Soil 20

5.4.4 Other substrata 20

5.4.5 Water 21

5.5 Apparatus 21

5.5.1 Open-surface germinators 21

5.5.2 Cabinet germinators 21

5.5.3 Room germinators 21

5.6 Procedure 22

5.7 Test conditions 22

5.7.1 Temperature 22

5.7.2 Light 22

5.7.3 Moisture and aeration 23

5.7.4 Special treatments for breaking dormancy 23

5.7.5 Duration of the test 23

5.8 Seedling evaluation 23

5.9 Calculation and expression of germination results 24

5.9.1 Retesting 24

5.10 Reporting results 25

6. Moisture content determination 26

6.1 Object and definition 26

6.2 General principles 26

6.2.1 Weighing 26

6.2.2 Apparatus 26

6.2.3 Working sample 26

6.2.4 Grinding 26

6.3 Procedure 26

6.4 Calculation and expression of results 27

7. Biochemical test for viability 28

7.1 Object 28

7.2 Definitions 28

7.3 General principles 29

7.4 Materials 29

7.5 Procedure 29

7.5.1 Working sample 29

7.5.2 Preparation of the seeds before staining 29

7.5.3 Staining 29

7.5.4 Preparation for evaluation 29

7.5.5 Evaluation 30

7.6 Calculation and expression of results 30

7.7 Reporting results 30

Acknowledgments 31

LIST OF TABLES

Table 1. Lot and sample weights for purity and germination tests of tree seeds 9

Table 2. Germination prescriptions for testing tree seeds 18

Table 3. Maximum tolerated ranges between replications 24

Table 4. Compatability of tests 25

Table 5. Tolerance levels for difference between two determinations of moisture content 27

Table 6. Procedures for tetrazolium tests on tree seeds 28

Abstract

Standardized methods and procedures for sampling, and for testing purity, germination, moisture content and seed weight of forest tree seeds are described. This manual was originally prepared to support administration of Forest Tree Seeds Regulations proposed for incorporation into the Seeds Act of Canada. Support for the new regulations has been withdrawn as the federal government is following a policy to reduce regulation. Yet the need for uniform and standardized methods of assessing tree seed quality remains. The manual will be revised as new testing procedures are developed.

Preface

Parliamentary authority to regulate the quality and sale of seeds in Canada dates back to 1905 with the introduction of the Seed Control Act. The Act and its Regulations were revised on several occasions, but without reference to forest tree seeds. In 1977, a definition for seeds that specifically recognized forest tree seeds was incorporated into the Seeds Act, but the Regulations, developed expressly for agricultural crops, remained unaltered and inappropriate for forestry materials.

The use of forest tree seeds in Canada is subject to different degrees of control, depending on the needs and resources of the different provinces and territories. Each provincial or territorial department responsible for forestry must ensure that the seeds and seed sources within its jurisdiction are properly used. In plenary session, the National Workshop on Tree Seed Production and Tree Improvement in Canada[1] recommended that the Canadian Forestry Service (CFS) obtain delegated authority under the Canada Seeds Act to certify and regulate tree seeds. In anticipation of the new authority, the CFS drafted regulations for inter-jurisdictional seed transactions. These regulations were designed to safeguard forest renewal by setting basic rules for labeling, establishing services for identification of seed origin and testing seed quality, monitoring long-distance movement of seeds, and controlling undesirable importations. Although these reasons for tree seed regulations remain, the federal government's present policy is to reduce regulation, and support for the CFS proposals has been withdrawn.

However, if the proposed regulations had been incorporated into the Seeds Act, the present manual, "Methods and procedures for testing tree seeds in Canada," would have been incorporated as an appendix to the regulations. This manual establishes uniform standards for testing the physical quality of tree seeds in this country—standards that could have far-reaching benefits for forest renewal and production in the future. Although no longer regulatory, the manual is still useful to all individuals and agencies concerned with forest regeneration.

The following pages detail the recommended testing standards. The methods and procedures will be revised to keep pace with the dynamic nature of the material to which they apply. New seed testing techniques, which provide increased accuracy and reliability in test results, will be incorporated into the manual as they are developed.

[1]Morgenstern, E.K.; Carlson, L.W. (editors). 1979. Tree seed production and tree improvement in Canada – Research and Development Needs 1977-1987. Environ. Can., Can. For. Serv. Info. Rep. PS-X-74.

1. *Introduction*

1.1 Objective of seed testing

Of all the hazards in producing plants from seeds, the use of inferior seeds is one of the greatest. The principal objective of seed testing is to minimize this risk by assessing the quality of the seeds by standardized methods before they are sown. "Seed quality" incorporates many attributes that are of interest to different people: to the producer, the processor, the dealer or merchant, the nurseryman, the certification authority or agency responsible for seed control. In all instances, the ultimate objective of quality testing is to determine the value of the seeds for plant production. The methods and procedures described herein were developed to meet the specific analytical requirements for administering the Seeds Act and the proposed Forest Tree Seeds Regulations.

1.2 Responsibility of seed analysts

Tree seed analysts should keep in mind that the ultimate purpose in testing is to determine the value of the seeds for seedling production. Seeds are living organisms and their behavior is not as predictable as that which characterizes inert or nonbiological materials. The test methods used must be based on scientific knowledge of the seeds and the accumulated experience of seed analysts, and must adhere to established standards and procedures.

1.3 Need for uniform testing methods

As seeds move across provincial and territorial boundaries within Canada, or are imported into or exported from this country, they may be tested in various laboratories. It is essential that these laboratories use standardized tests to ensure comparable results within an acceptable range. This publication describes the methods and procedures necessary for conducting the tests in a uniform manner.

2. *Sampling*

2.1 General outline

There are two principal objectives in sampling. The first is to obtain a sample of a size that is suitable for testing. The second is to make sure that the constituents of the sample represent the same types in the same proportion as in the main seed lot. This second objective is most important.

The quantity of seeds tested in the laboratory is very small compared to the size of the seed lot that it is intended to represent. No matter how accurately the laboratory work is done, the results can only show the quality of the sample submitted for analysis. This applies to all types of tests whether they assess purity, germination, weight, moisture content, or involve X-ray analysis or other kinds of determinations.

Forest tree seeds often present problems for the sampler since many lots contain high percentages of empty seeds. In some conifer genera such as *Abies* and *Larix*, empty seeds frequently fill up with woody tissue so that their density becomes similar to that of viable seeds, making them difficult to sort during seed processing. Even though seed lots may be mixed to render them homogeneous, experience has shown that high numbers of empty seeds can make it difficult to draw representative samples. The effect of a large proportion of empty seeds may be twofold: (i) the quality (in whatever manner it is measured) of the sample may not represent the seed lot as a whole, or (ii) there may be so much variation between the replications used in the test that the result is useless. Samplers should recognize that, as containers are handled in seed processing, empty seeds and wings (impurities) tend to work to the top.

Seed analysts must ensure, therefore, that sampling procedures are correctly followed at all times. X-ray techniques allow the identification of empty seeds as well as other seed characteristics. Even if there are no empty seeds, some other condition may render a portion of the seed lot unusable for seedling production. The sample must represent this condition. It cannot be over-emphasized that no matter how well the laboratory testing is performed, the results show only the quality of the sample tested. Every effort must be made to ensure that the sample tested truly represents the composition of the seed lot in question.

2.2 General principles

A sample is obtained by taking small portions at random from different positions in the seed lot and combining them. From this sample, smaller subsamples are obtained by one or more steps. At each step, thorough mixing is followed either by progressive subdivision or by abstracting at random still smaller portions which are then recombined.

2.3 Definitions

Lot:
A specified, physically identifiable quantity of seeds. A lot, or seed lot, may be small and in a single container, or large and require several containers.

Primary sample:
A small portion taken from one point in the lot.

Composite sample:
Formed by combining and mixing all the primary samples taken from the lot. The composite sample is usually much larger than required for various tests (Section 2.5.4) and in that case it must be reduced.

Submitted sample:
The sample submitted to the testing station. The submitted sample comprises part of the composite sample.

Working sample:
A reduced sample taken from the submitted sample in the laboratory, on which one of the quality tests is made.

2.4 The seed lot

For the purposes of international trade in tree seeds, a maximum size (subject to a tolerance of 5%) of a seed lot for most species has been set at 1000 kg (Table 1). This maximum is recommended for all seed transactions. If the amount of seeds exceeds the specified maximum, it should be divided into lots not larger than the maximum and each portion given a separate lot identity.

The seed lot should be as uniform as practicable and should not, at the time of sampling, show evidence of heterogeneity in seed size and color or amount and type of impurities, among containers or among different parts of any one container. Uniformity is usually taken for granted unless there are obvious differences, in which case sampling must not proceed until the merchant has mixed the lot satisfactorily.

2.5 Procedure for sampling a seed lot

2.5.1 General directions

The merchant (or owner of the seeds) must ensure that the seed lot is accessible and that all the containers for one lot are together.

Table 1. Lot and sample weights for purity and germination tests of tree seeds

Species	*Maximum weight of lot (× 1000 kg)*	*Minimum sample weights*	
		Submitted sample (g)	*Working sample for purity analysis (g)*
Abies amabilis (Dougl. ex Loud.) Forb.	1	200	100
Abies balsamea (L.) Mill.	1	240	120
Abies grandis (Dougl. ex D. Don) Lindl.	1	100	50
Abies lasiocarpa (Hook.) Nutt.	1	70	35
Acer rubrum L.	1	100	50
Acer saccharinum L.	1	1000	500
Acer saccharum H. Marsh.	1	360	180
Aesculus hippocastanum L.	5	>500 seeds	>500 seeds
Alnus rubra Bong.	1	15	2
Betula papyrifera H. Marsh.	1	10	3
Chamaecyparis nootkatensis (D. Don) Spach	1	25	10
Fraxinus spp.	1	400	200
Larix laricina (Duroi) K. Koch	1	25	10
Larix occidentalis Nutt.	1	25	10
Picea abies (L.) Karst.	1	40	20
Picea engelmannii Parry ex Engelm.	1	25	9
Picea glauca (Moench) Voss	1	25	5
Picea mariana (Mill.) B.S.P.	1	25	3
Picea rubens Sarg.	1	25	9
Picea sitchensis (Bong.) Carr.	1	25	6
Pinus albicaulis Engelm.	1	700	350
Pinus banksiana Lamb.	1	25	9
Pinus contorta Dougl. ex Loud.	1	25	9
Pinus flexilis James	1	500	250
Pinus monticola Dougl. ex D. Don	1	90	45
Pinus nigra Arnold	1	100	50
Pinus ponderosa Dougl. ex P. et C. Lawson	1	200	100
Pinus strobus L.	1	90	45
Pinus sylvestris L.	1	40	20
Populus spp.	1	5	2
Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco	1	60	30
Quercus spp.	5	>500 seeds	>500 seeds
Salix spp.	1	5	2
Taxus spp.	1	320	160
Thuja plicata Donn ex D. Don	1	10	3
Tsuga canadensis (L.) Carr.	1	25	7
Tsuga heterophylla (Raf.) Sarg.	1	10	4
Tsuga mertensiana (Bong.) Carr.	1	10	4

To secure a representative sample, equal portions of seeds must be taken from evenly distributed parts of the seed lot to be sampled. Sampling must be carried out by persons employed by, or recognized and appointed by, the seed testing laboratory concerned, and who are trained and experienced in seed sampling. Alternatively, the merchant may submit a sample of a seed lot for analysis, in which case the results obtained should only be applied to that sample, and not to the lot as a whole.

2.5.2 Apparatus and sampling method

Whenever possible, samples of free flowing seeds must be withdrawn from the lot by either of the two following methods.

(a) Stick or sleeve-type trier

The trier consists of a hollow tube which fits inside an outer sleeve with a pointed end. The tube and the sleeve have open slots in their walls and when the slots in the tube line up with slots in the sleeve, seeds can flow into the cavity of the tube. A half-turn of the tube closes the openings. Triers are available in various sizes and they may be used either vertically or horizontally. Vertical use is best when the seeds are in boxes or other rigid containers, whereas horizontal insertion may be used if the seeds are in sacks of woven material. When inserted vertically, the trier must have partitions dividing the tube into a number of compartments; otherwise, seeds will drop into the sampler from the upper layers leading to an over-representation of these layers when the sample is withdrawn.

The closed trier should be inserted diagonally into the container until it reaches the lowest layers of seeds. It must not be pushed through the bottom of the container, especially in the case of plastic bags inside a rigid carton. The trier is then opened by a half-turn of the inner tube and gently agitated to allow each compartment to fill completely. It is then reclosed and withdrawn and the seeds it contains are emptied into a pan or onto a sheet of paper. The trier must be closed gently so that seeds caught between the slot edges of the inner and outer tubes are not damaged.

The seeds obtained from this sequence comprise one primary sample. For seed lots occupying more than one container, primary samples are withdrawn according to Section 2.5.3.

Triers work best on seed lots of moderate to large size. When small seed lots (of only a few kilograms weight) cannot be sampled by means of a trier, other methods, such as the use of a soil divider or manual sampling, must be used.

(b) Soil divider

The soil divider, originally devised for sampling soil, consists of a hopper with attached channels or ducts mounted in a frame, two receiving pans, and a pouring pan. The channels, which are arranged in a straight line, have sloping floors that deflect the seeds towards one side of the hopper or the other. The floors of adjacent channels slope in opposite directions and those of alternate channels slope in the same direction. Some units are equipped with a gate, or valve, between the hopper and the channels which must be opened before the seeds fall through. In other units, the width of the channels is adjustable so that they may be used with seeds of various sizes. For satisfactory results, all dividers should be operated as follows:

(i) With the hopper valve (if so equipped) closed, seeds are poured into the hopper so that they are evenly distributed along its entire length.

(ii) With the receiving pans in position, the hopper valve is opened completely so that the seeds fall smoothly and collect in the pans beneath. For correct seed distribution, the valve must be opened wide so that seeds do not fall more towards one pan or the other.

The seeds collected in each receiving pan comprise a representative half of the original amount of seeds placed in the hopper.

Samples can be mixed by passing the seeds through the divider three or four times, recombining the two halves from the receiving pans after each pass. More passes may damage delicate seeds. Following mixing, the sample is again divided into two parts, one of which is returned to the container while the seeds in the other part are divided again. This is repeated until the seeds in one pan are of a quantity approximately equal to, but not less than, the prescribed weight for the submitted sample (Table 1). Since the use of a soil divider is usually reserved for seed lots too small to be properly sampled by a trier, the entire seed lot is passed through the divider. In this procedure the sampler arrives at the submitted sample directly.

(c) Manual sampling

In the absence of mechanical sampling devices, or if the seeds do not flow freely, they may be sampled manually. In this method, the fingers and thumb are kept straight, and together, and the hand is pushed to the required depth in the container. The fingers are tightly closed around a portion of seeds and the hand is withdrawn. This procedure is repeated in several positions in the container. Containers deeper than 40 cm may have to be emptied or partially emptied to facilitate sampling of lower portions.

2.5.3 Sampling intensity

In some instances, seeds may be in one very large container, such as a rail car or the hold of a freighter, although it is unusual for forest seeds to be handled in this manner. For bulk seeds up to 50 kg, at least three primary samples are required. Between 51 and 500 kg, at least five primary samples are needed. For more than 500 kg and up to 3000 kg, one primary sample for every 300 kg, with a minimum of five samples, must be taken. If the bulk exceeds 3001 kg, one primary sample for every 500 kg, with a minimum of 10 samples, must be taken.

More frequently, forest seeds are packaged in containers; any one merchant often will use containers all of the same shape and size. Irrespective of how much each container holds, if there are one to five containers, each one must be sampled and a total of at least five primary samples must be taken. Between 6 and 30 containers, one in every three with a

minimum of five containers must be sampled. For 31 or more containers one in every five, with a minimum of 10 containers must be sampled.

When the number of containers sampled is small, the combined primary samples (the composite sample) may be too small so the containers have to be sampled more than once. To ensure equal representation in the composite sample, each container must be sampled the same number of times. With experience, a sampler will learn the weight of seeds by species that can be removed by one insertion of a trier, enabling a prior estimate of the number of primary samples to be removed from each container. It is better to have too large a sample than one that is too small.

Sometimes a variety of different-sized small containers may be used. A number of such containers should be combined so that the total weight does not exceed 100 kg; for example, 20 containers of 5 kg each or 33 containers of 3 kg each. Each 100-kg combination should then be regarded as one "container" to which the prescription for sampling intensity (above) is applied.

2.5.4 Obtaining the samples

Whatever sampling method is used, primary samples of approximately equal size must be taken from each container that is sampled, or from each place sampled in each container, or from each location sampled in bulk. For containerized seeds, containers are selected at random throughout the seed lot and primary samples drawn from the top, middle and bottom of the containers, although not necessarily from more than one position in any one container.

Provided the primary samples appear uniform, they are combined and mixed to form the composite sample. The submitted sample is obtained by reducing the composite sample to an appropriate size by an approved method; in most cases, the soil divider is adequate. If it is difficult to mix and reduce the sample at the sampling station, the entire composite sample may be forwarded to the laboratory for reduction. If the composite sample is of the appropriate size, it may be regarded as the submitted sample without reduction.

2.5.5 Weight of the submitted sample

There are two basic types of tests for tree seeds and different sizes of samples are required.

If the sample is for a moisture content test, at least 50 g of seeds must be submitted to the laboratory. This increases to 100 g for genera such as *Fagus* (beech) and *Quercus* (oak) whose seeds must be ground up before moisture content can be measured.

If the sample is for purity and germination testing, the minimum weight of seeds is specified in Table 1.

2.6 Transporting the sample to the laboratory

If the sample is intended for moisture content tests, it *must* be packaged in a moisture-proof container from which as much air as possible has been excluded. A paper envelope placed in a sealable plastic bag is usually adequate.

If the sample is for purity and germination tests, a moisture-proof container must also be used if the seed lot from which it was taken had been dried to low moisture content and had been stored under moisture-proof conditions. This applies to conifer seeds which are dried to less than 10% moisture content for storage. Under any other circumstances, and especially for broadleaved species that must not be dried to low moisture levels, the submitted samples for germination tests must not be transported in moisture-proof packages.

All samples must be packed so as to prevent damage during transit. They must be dispatched, or delivered, to the seed testing laboratory without delay and must not be left in the hands of the owner, applicant, or other individuals not authorized by the sampling agency.

2.7 Storage of samples

2.7.1 Before testing

Every effort is to be made to begin testing a sample on the day it is received. If this is not possible, the sample should be refrigerated between 1 and 3°C (not frozen) to minimize changes in seed quality. Storage of large seeds from genera such as *Quercus*, *Aesculus*, or *Castanea* is difficult because of their naturally high moisture content.

2.7.2 After testing

Submitted samples must be stored by the testing laboratory for 1 year from the date of issue of the test report. Storage conditions should minimize any change in seed quality, but the testing laboratory is not liable for any change that occurs. This storage allows for a retest without the need to withdraw a fresh sample from the lot. When a retest is required, a new germination sample is drawn from the remainder of the pure seed component of the

original working sample in accordance with the procedures described in Sections 3.4.1 and 3.4.2.

2.8 Laboratory sampling

Laboratory sampling procedures to reduce the size of the submitted sample to the appropriate working sample are described in detail in Section 3.4.2.

2.9 Marking and sealing the lot

2.9.1 General directions

When sampling has been carried out by an employee of the seed testing station, the merchant must use containers that can be sealed to prevent unauthorized opening. The containers must also be labeled and marked for identification by a single lot designation. At the time of sampling, all containers must be labeled or marked to show a lot identification corresponding to the lot identification on the report. The lot identification must be approved or allotted by the seed testing laboratory concerned.

The containers must be sealed, or seen to be sealed, by the sampler immediately after sampling. A container is to be regarded as sealed if it is apparently impossible to open it without either destroying the seal or leaving evidence of tampering. Each container must have affixed to it, under the control of the sampler, an officially recognized seal, or indelible mark, or non-removable label. The sampled lot, or part thereof, must not be left unsealed.

Canadian tree seed merchants frequently place seeds in a plastic bag (the container) which is enclosed in a cardboard box for shipping. It is the plastic bag or container that must be sealed, and the following method has been devised.

2.9.2 Procedure for marking and sealing

Two metal labels printed with the name of the seed testing station and the official sample number are used as "Official Marks." The Official Mark is recorded on the report for each lot. One label is placed inside the container as a precaution against the second, outer label becoming detached. A self-locking plastic tie is placed around the neck of the container and a lead-plug-on-wire seal is then attached. The complete sequence of marking and sealing is as follows.

(i) If the seed lot has been OECD certified,[2] the appropriate OECD tag together with a metal label (the Official Mark) are placed within the container on top of the seeds.

(ii) The top of the bag is tightly twisted. If the bag is already inside the shipping box, as much air as possible should be squeezed out of the bag. If the bag is to be fitted into a box later on, some air may be left in the bag as this makes the container more flexible.

The plastic tie is placed around the twisted part of the bag and pulled tight.

(iii) The tie, though difficult to remove, can be unlocked. To prevent this, it is pierced close to the self-locking head with a needle.

(iv) The wire of the lead seal is passed through the hole made by the needle. The second embossed metal label is threaded onto the wire, together with the second OECD tag. (If the seed lot has not been OECD certified, there will be no OECD tag either inside or outside the container. In some instances another tag, often the seed merchant's own identifying tag, may be threaded onto the wire with the second embossed metal label.)

(v) The wire is passed through both holes in the lead plug, and a pair of crimping pliers is used to squeeze the plug onto the wire. In doing so, the jaws imprint the initials of the seed testing station on the faces of the lead seal. Although the wire can be pulled with difficulty out of the plug, if this is done the plug is deformed and the wire cannot be replaced. This makes the sealing system essentially tamper-proof.

[2]Piesch, R.F.; Stevenson R.L. 1976. Certification of source-identified Canadian tree seed under the OECD scheme. Dep. Fish. Environ., Can. For. Serv., For. Tech. Rep. 19, 18 p.

3. *Purity Analysis*

3.1 Object

The objective of the purity test is to determine the proportion of seeds in a container and how much other matter, such as needles or cone scales, there may be. The analysis determines the composition by weight of three components: pure seeds of the crop species, seeds of other species, and inert matter.

3.2 Definitions

Pure seeds:
Seeds of the species stated by the sender, or found to predominate in the test, including all botanical varieties and cultivars of that species. The following structures (even if immature, undersized, shriveled, diseased, or germinated, provided they can be definitely identified as of that species) are regarded as pure seeds, unless transformed into fungal sclerotia, smut balls, or nematode galls.

(i) Intact seeds (i.e., seeds in the botanical sense). For most conifer species this means seeds with the wing and enclosing integument removed (Section 3.3); exceptions are seeds of *Chamaecyparis*, *Cupressus*, and *Thuja*.

(ii) Pieces of seeds resulting from breakage, which are more than one-half their original size. However, seeds of conifer species with the seed coats entirely removed are regarded as inert matter.

Other seeds:
Seeds and seedlike structures of any plant species other than that of the pure seeds. The distinguishing characteristics set out for pure seeds are also applicable to other seeds.

Inert matter:
(i) Pieces of broken or damaged seeds one-half the original size or less, and conifer seeds with the seed coats entirely removed. (Broken seeds must be given special attention, to determine if they are one-half the original size or less and to be counted as inert matter, or more than one-half the original size and therefore counted as pure seeds.)

(ii) Soil, sand, stones, chaff, stems, leaves, conifer needles, cone scales, wings, pieces of bark, flowers, buds, insect larvae, and all other matter not seeds.

3.3 Wings and Integuments

The wing of *Acer*, *Betula*, *Chamaecyparis*, *Cupressus*, and *Thuja* seeds is regarded as a part of the seed and is not removed in processing. Therefore, the pure-seeds fraction of these genera consists of seeds with intact wings.

In *Abies*, *Larix*, and *Pseudotsuga* the integument, which attaches the wing to the seed, is difficult to remove in normal processing without causing damage. The wings are easily detached leaving the integument attached to the seeds. In contrast, the wing and integument are not difficult to remove in *Pinus*, *Picea*, *Cedrus* and *Tsuga* seeds, so samples of these species should not contain such impurities.

3.4 Testing Procedure

At least 2500 seeds must be examined in a purity analysis, subject to a minimum of 0.5 g for very small seeds and a maximum of 1000 g for very large seeds. Specific sample weights are prescribed in Table 1.

The purity analysis is conducted on a working sample taken from the submitted sample.

3.4.1 Obtaining the working sample

The submitted sample is larger than the working sample on which the tests are conducted for two reasons: (i) the testing laboratory must retain part of the submitted sample for 1 year to permit retests to be conducted when necessary (Section 2.7.2) and (ii) it provides material for a second test should the initial test have to be abandoned or discarded. Thus, the submitted sample received by the testing laboratory generally must be reduced to a working sample.

3.4.2 Sampling procedure in the laboratory

The submitted sample must be thoroughly mixed and the working sample obtained by repeated halving using one of the following procedures.

(a) Mechanical divider method
The mechanical divider method is suitable for free-flowing seeds. The apparatus divides a sample into two approximately equal parts (Section 2.5.2(b)). The sample is reduced by successive halving until a working sample of approximately the prescribed size (Table 1), but not less, is obtained.

Several types of divider may be used:

(i) The soil divider described in Section 2.5.2(b).

(ii) The conical (or Boerner) divider. The conical divider works in the same manner as the soil divider except that the channels are arranged around the base of a cone. Seeds are retained in the hopper until the release valve is opened, when they flow down over the cone and into the dividing channels. Like the soil

divider, the conical divider splits the seed mass into two representative parts. One part is repeatedly divided until reduced to the required sample size.

(iii) The centrifugal (or Gamet) divider. Seeds flow out of the hopper of the centrifugal divider into a shallow rubber cup, or spinner, which is rotated on a vertical shaft turned by an electric motor. Centrifugal force throws the seeds out of the spinning cup and they fall onto the dividing area. A stationary baffle diverts approximately half the falling seeds into each exit spout. To ensure consistent results the divider must be leveled using its adjustable feet. Seeds can be mixed, or a sample reduced in size, using the procedures described for the soil divider (Section 2.5.2(b)) and the conical divider (Section 3.4.2(a)(ii)).

(b) Random cups method
Small cups or containers, usually no more than eight, are randomly placed on a tray and the seeds of the submitted sample are evenly poured over the tray. Most of the seeds fall on the tray, but some collect in the cups and these are combined in a larger container as the working sample. The process may have to be repeated if insufficient seeds collect in the cups the first time. Larger or smaller cups may be used to suit seed size. The random cups method is suited for species requiring working samples up to 10 g.

(c) Modified halving method
In the modified halving method a grid of equal-sized cubical cells is used; all cells are open at the top, but alternate cells have no bottom. The grid is placed on a tray or large sheet of paper and seeds are poured evenly over it, covering the entire grid. When the grid is lifted some of the seeds remain in it, the rest being on the tray. The process is repeated if the amount of seeds collected in the grid is less than required. If too many seeds collect in the grid, these are reduced using the same process. Cell dimensions of 50 mm × 50 mm × 50 mm have been found useful for conifer seeds. The grid can be constructed easily from thin plywood or plastic strips 50 mm wide that are half-jointed together. Squares of cardboard or similar material can be glued or stapled on to form the cell bottoms.

(d) The spoon method
After mixing, the submitted sample is poured evenly over a tray. Using a spoon and spatula small portions of seeds are removed from at least five random positions until the required amount is obtained. The spoon method is used only for small-seeded species.

In methods (b), (c), and (d) the analyst should cover the tray or grid evenly, rather than filling the cups or cells, with a side-to-side swing first in one direction and then at right angles.

3.4.3 Purity separation

The working sample is weighed to the number of decimal places specified in Section 3.4.4, and the weight recorded. This original weight, before the sample is separated into components, is required as a check against loss of material during separation.

The working sample is then separated by hand into its three component parts: pure seeds, other seeds, and inert matter, as defined in Section 3.2. Each particle is examined and identified in a manner that does not harm the capacity of the pure seeds to germinate. Special attention must be given to damaged seeds (Section 3.2) and to wings and integuments (Section 3.3). Seeds that show no evident damage to the testa are regarded as pure seeds (or seeds of other species) irrespective of whether they are empty or full. It is not necessary to turn over individual seeds to determine the presence of holes or other damaged areas on the underside. When broken seeds are present, the analyst must decide whether the remaining solid portion of a seed is more than half the original size and apply rule 3.2.(ii) accordingly. Decorticated seeds, that is, seeds of conifer species from which the seed coat has been removed entirely, are classed as inert matter (Section 3.2).

3.4.4 Weighing, calculation, and expression of results

After separation each component part is weighed to the minimum number of decimal places necessary to calculate the percentages to one decimal place, as follows:

Weight of working sample in grams	*Number of decimal places*
Less than 1	4
1 to 9.999	3
10 to 99.99	2
100 to 999.9	1
1000 or more	0

The percentage of all components must total 100. Components of less than 0.05% should be reported as "Trace". If the result for any component is nil, it should be reported as such. All scientific names must be in accordance with Table 1.

Percentages must be based on the sum of the weights of the components, not on the original weight of the working sample; but the sum of the component weights must be compared with the original weight as a check against loss of material, or other error (Section 3.4.3). If the weight loss is 1% or more of the original weight of the sample, a new working sample must be drawn and the separation must be repeated. The percentage of seeds of a species other than the pure seeds, or of any particular kind of inert matter, need not be calculated and reported unless they are found to be present to the extent of 1% or more.

If some seeds in the working sample still bear entire wings (*Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*) or parts of integuments and wings (*Pinus*, *Picea*, *Cedrus*, *Tsuga*), they must be separated from seeds free from such impurities and weighed separately. These two weights are combined to give the total component weight for "pure seeds." However, the weight of those seeds bearing such impurities is to be expressed as a percentage of the total pure seed component, and reported separately as such. The weight of impurities, such as wings and integuments, that are still attached to the seeds is not determined.

4.1 Object

This test determines the weight per 1000 seeds of the sample as submitted; it is usually performed at the same time as the purity test. This information is useful to the grower in calculating the number of seeds in a weighed container.

4.2 Procedure

Either all the seeds in the entire pure seed fraction or seeds in replications drawn from the pure seed fraction are counted. Since the weight of the pure seed fraction is known, the weight per 1000 pure seeds can be calculated easily.

4.2.1 Counting replications

The replication procedure is more commonly employed since the same replications are used in the germination tests (Section 5). Eight replications of 100 seeds each are drawn randomly from the pure seed fraction. Each of the eight replications is weighed to the same number of decimal places as in the purity analysis (Section 3.4.4), and the average weight per 100 seeds is calculated.

4.2.2 Calculation and expression of results

Calculate the variance, standard deviation, and coefficient of variation (CV) as follows:

$$\text{Variance} = \frac{n(\xi x^2) - (\xi x)^2}{n(n-1)}$$

where x = weight of each replication in grams, n = number of replications, ξ = sum of.

Standard deviation,

$$s = \sqrt{\text{variance}}$$

Coefficient of variation,

$$\text{CV} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

where $\bar{x}$ = average (mean) weight of 100 seeds.

If the CV exceeds 4.0, a further eight replications should be counted and weighed and s calculated for the 16 replications. Any replication that diverges from the mean ($\bar{x}$) by more than twice the standard deviation so calculated is discarded.

The average weight of 100 seeds from the eight or more replications is multiplied by 10 (i.e., $10 \times \bar{x}$) to determine the average weight of 1000 seeds. The result must be expressed to the same number of decimal places as used in the purity analysis (Section 3.4.4).

5. *Germination Test*

5.1 Object

The germination test, which may be the most important function of a seed testing laboratory, determines the field-sowing value of the seeds, and compares the field values of different seed lots. Although field testing may be used, the results normally are unsatisfactory since such tests are difficult to repeat with reliability. Methods for laboratory testing control some or all of the major environmental factors that influence germination. Combinations of the factors that are optimal, and that produce the most regular, rapid, and complete germination for a majority of the seed lots of a particular species, have been developed into standardized procedures. These procedures enable test results to be reproduced within limits as near as possible to those determined by random sample variation.

The laboratory methods prescribed in the following sections must be used in all germination tests for official purposes (that is, tests with public significance). On seed samples that do not respond to the usual methods, the analyst may try other or modified methods to procure all the possible information about viability and germinability. If a method other than a prescribed method is used, it must be indicated on the report.

5.2 Definitions

Seed germination:
The emergence and development from the seed embryo of those essential structures that, for the kind of seed being tested, indicate its ability to produce a normal plant under field conditions. In a laboratory germination test, it is the plant-producing potential of a seed sample that is evaluated.

Germination percentage:
The proportion per 100 seeds of the original sample that have produced seedlings classified as normal within the period specified (Section 5.7.5).

Normal seedlings:
Those seedlings that possess the essential structures that indicate their ability to produce normal plants under field conditions.

Abnormal seedlings:
Seedlings that are defective in one or more respects and which cannot be classified as normal seedlings. Seedlings with the following defects when tested on artificial substrata are to be classed as abnormal:

(i) Damaged seedlings — seedlings without cotyledons; with constrictions, splits, cracks, or lesions that are neither superficial nor limited in area, on the essential structures; without a primary root (of those species where a primary root is an essential structure).

(ii) Deformed seedlings — seedlings with weak or unbalanced development of the essential structures such as spirally twisted or stunted plumules, hypocotyls, or epicotyls; with swollen shoots and stunted roots; which are watery and glassy; or in which development stops after initial emergence.

(iii) Decayed seedlings — seedlings with any of the essential structures so diseased or decayed that normal development is prevented, except when there is clear evidence that the cause of infection is not the seed itself.

Fresh seeds:
Seeds that have imbibed moisture and appear firm and capable of germination, but which have not begun to germinate at the end of the prescribed test period and under the prescribed test conditions.

Dormant seeds:
Seeds that, due to a physiological condition within the seed, to physical characteristics of the seed coat, or to the stage of development of the embryo, will not germinate under the prescribed test conditions unless they are first treated to break dormancy. This definition includes seeds, such as those of the Leguminosae and Malvaceae, that remain hard because their impermeable seed coats prevent water absorption.

Dead seeds:
Seeds that are neither hard nor fresh and have not produced seedlings at the end of the test period.

Empty seeds:
Seeds that are completely empty or contain some residual tissue showing neither endosperm nor embryo.

Insect-damaged seeds:
Seeds that contain insect larvae or frass, or show other evidence of insect attack that apparently affects the ability of the seeds to germinate.

Temperature:
The temperature at the position where the seeds are placed for germination. Recommended germination temperatures for various kinds of seeds are given in Table 2 (See also Section 5.7.1).

Table 2. Germination prescriptions for testing tree seeds

The less desirable methods and conditions are placed in parentheses.
The abbreviations have the following meanings:

TP – *top of paper*
S – *sand*
TS – *top of sand*
TZ – *tetrazolium test*

Species	*Substrata*	*Temperature (°C)*	*First count (days)*	*Final count (days)*	*Additional directions including recommendations for breaking dormancy*
Abies amabilis *Abies grandis*	TP	20–30	7	28	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests.
Abies balsamea *Abies lasiocarpa*	TP	20–30	7	28	Prechill 21 days at 1–5°C.
Acer rubrum	S(TP)	20–30	7	21	Prechill 42 to 56 days at 1–5°C.
Acer saccharinum	S(TP)	20–30	7	14	
Acer saccharum	S(TP)	20	7	21	Prechill 2 months at 1–5°C. It is advantageous to remove pericarp before testing. Fresh undried seeds are usually more dormant than dried and/or stored seeds.
Aesculus hippocastanum	S	20–30 (20)	7	21	Soak seed 48 hours; cut off ⅓ at scar end of seed. Do not remove testa from sown portion. Fresh nuts may require prechill.
Alnus spp.	TP	20–30	7	21	
Betula alleghaniensis	TP	20–30	7	21	Prechill 21 days at 1–5°C.
Betula papyrifera	TP	20–30	7	21	Use 8–16 h light.
Chamaecyparis nootkatensis	TP	20 (20–30)	7	28	(1) Soak as for prechilling, but maintain seeds at 20–25°C (room temperature) for 30 days, then prechill 120 days at 1–5°C. (2) Use TZ.
Fraxinus spp.	— (TP)	— (20–30)	— (14)	— (56)	(1) Use TZ. (2) (Pretreat seeds 2 months at 20°C followed by 7 months at 1–5°C).
Larix laricina	TP	20–30	7	21	
Larix occidentalis	TP	20–30	7	21	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests.
Picea abies *Picea mariana* *Picea rubens*	TP	20–30	7	21	
Picea engelmannii *Picea glauca* *Picea sitchensis*	TP	20–30	7	21	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests. More than 8 h light may benefit some lots.
Pinus albicaulis	TP	20–30	7	28	Prechill 28 days at 1–5°C.
Pinus banksiana	TP	20–30	7	14	
Pinus contorta	TP	20–30	7	21	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests.
Pinus flexilis	TP	20–30	7	21	Prechill 21 days at 1–5°C.
Pinus monticola	TP	20–30	7	21	(1) Soak as for prechill, but maintain seeds at 20–25°C (room temperature) for 30 days, then prechill 60 days at 1–5°C. (2) Use TZ.

Table 2 contd.

Species	*Substrata*	*Temperature (°C)*	*First count (days)*	*Final count (days)*	*Additional directions including recommendations for breaking dormancy*
Pinus nigra	TP	20–30	7	21 (14)	
Pinus ponderosa	TP	20–30	7	21	No prechill and prechill 35 days at 1–5°C. Double tests.
Pinus strobus	TP	20–30	7	28	(1) Prechill 21 days at 1–5°C. More than 8 h light may benefit some lots. (2) Use TZ.
Pinus sylvestris	TP	20–30 (20)	7	21 (14)	
Populus spp.	TP	20–30	3	10	
Pseudotsuga menziesii	TP	20–30	7	21	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests.
Quercus spp.	S	20	7	28	Soak seed for up to 48 hours, then cut off ⅓ at scar end of seed and remove testa.
Salix spp.	TP	20–30	7	14	
Sequoiadendron giganteum	TP	20–30	7	28	
Taxus spp.	— (S)	— (20–30)	— (7)	— (28)	(1) Use TZ. (2) (Prechill 9 months at 1–5°C).
Thuja spp.	TP	20–30	7	21	
Tsuga canadensis	TP	15	7	28	Prechill 28 days at 1–5°C.
Tsuga heterophylla *Tsuga mertensiana*	TP	20	7	35	No prechill and prechill 21 days at 1–5°C. Double tests.

Prechilling:
Placing the seeds on or in a moist substratum at a constant temperature between 1 and 5°C for a specified period to overcome suspected dormancy. Seeds may also be prechilled by soaking in tap water at room temperature (18-22°C) for 24 hours, draining the excess water, placing in a suitable glass or plastic vial or polyethylene bag, and cooling to between 1 and 5°C for a specified period. Recommendations for the prechilling period are given in Table 2 (See also Section 5.7.4).

5.3 General principles

Germination tests must be made with seeds from the pure seed fraction of a purity test carried out as in Section 3, for those kinds of seeds for which a purity separation is possible. The seeds must receive no pretreatments except those recommended in Table 2, unless requested by the sender. If additional tests are undertaken after any other pretreatment, the result and the pretreatment method must be reported. The seeds, arranged in replications, are placed on or in the substratum and maintained at a favorable moisture level under conditions of temperature and light as prescribed in Table 2. After the period indicated in Table 2, the replications are examined and counts made of the seeds and seedlings in the various categories required for reporting as specified in Section 5.8. First and intermediate counts may be made at an earlier stage provided the requirements of Section 5.7.5 are satisfied.

5.4 Materials

Several substrata are permissible for testing the seeds, including paper, sand, and soil.

5.4.1 Paper

In principle, any filter or blotting paper complying with the following should be suitable for the germination of most tree seeds. The paper should be open, porous, free from defects and impurities. It should be free from molds and bacteria and should not have been treated by the manufacturer against such organisms. It should contain no material toxic to germinating seeds. The fibre content should be 100% bleached chemical wood, cotton, or other vegetable cellulose and the paper should be white or colored with a nontoxic dye. The texture of the paper should be such that roots will grow on it but not into it;

the paper may be creped. When wet, the paper should not be less than 2 mm in thickness.

Toxicity of a paper can be checked by germinating one of several grass species, such as timothy (*Phleum pratense*), redtop (*Agrostis gigantea*), or Chewing's fescue (*Festuca rubra* var. *commutata*), and comparing root growth of the seedlings with those grown on a known, acceptable paper. Evaluation of root growth should be made after 5 days for timothy and redtop, and after 7 days for Chewing's fescue, because symptoms of slight root inhibition are more pronounced at an early stage of root growth. Symptoms of root inhibition due to toxic paper are shortened and sometimes discolored root tips, roots raised from the paper, root hairs "bunched," and plumules sometimes shortened.

A major disadvantage of all paper substrata is their tendency to permit rapid spread of molds. Although this effect can be minimized by spacing the seeds widely apart, in severe cases dead and moldy seeds may have to be removed during the test, and the paper may also have to be renewed.

5.4.2 Sand

Unless the sand is known to be free of toxic substances, pathogens, and foreign seeds, it should be sterilized. It should be free from fine (less than 0.05 mm) and large (more than 0.8 mm) particles. Its pH should be within the range of neutral to slightly acid (pH 6.0–7.0). Water is added to the sand to bring it to 50–60% of its water holding capacity, but the exact amount depends upon the type of sand and the kind of seeds to be tested; very large seeds will absorb more water so the initial moisture level should be higher. It may be necessary to remoisten the sand if it shows signs of drying out; a fine spray is best, but over-moistening should be avoided (Section 5.7.3). If the need for frequent remoistening is anticipated, the initial weight of the container with seeds may be recorded; when necessary, water is added to bring the weight back to the original. Sand is normally used to test large-seeded trees such as *Quercus*, *Aesculus* and *Castanea* or those that require a long germination period, for example *Carpinus*, *Fraxinus*, and *Rosa*, because it retards microbial development while maintaining a good supply of moisture and aeration to the seeds.

A major disadvantage of testing in sand is that roots intertwine and early assessments may disturb other seeds just beginning to sprout, leading to damage. Sand can be reused, but it must be sterilized before the next test. Sand should be discarded if there is any evidence of phytotoxicity.

5.4.3 Soil

Soil is more difficult to standardize and hence may lead to variation in results, so it is not generally recommended. It has a natural buffering action and its colloidal properties may render many toxins inactive. Soil, therefore, is a good substratum on which to check questionable results, and must be used to retest official samples that have shown phytotoxic symptoms when germinated on other substrata (Section 5.8). The soil should be of good quality, such as garden loam. Sand should be added if the soil tends to cake; water should be added such that the ball formed by squeezing it in the palm of the hand is easily broken when pressed between two fingers. After wetting, soil should be rubbed through a sieve to remove particles larger than 1 mm, and used without packing.

While other seed testing rules advise that sterilization of soil may be necessary to kill pathogens or foreign seeds, the natural microflora of a soil can inhibit growth of seed-borne fungi that may be lethal when the seeds are tested on paper. Steam sterilization of soil may cause the formation of phytotoxic compounds that can be removed only by the reinvasion and growth of microorganisms. Sterilized soil should be used, therefore, only if the level of pathogens or foreign seeds is such that results of the test may be obscured.

5.4.4 Other substrata

Any material used for testing tree seeds must satisfy the following basic requirements: (i) nontoxicity to germinating seeds; (ii) freedom from molds and other microorganisms; (iii) provision of adequate moisture and aeration; and (iv) ability to be employed in a standardized manner so that results can be reproduced. However, the use of such substrata other than paper, sand, or soil, as described in the previous sections, must be stated in the test report (Section 5.10).

One material extensively employed is "Kimpak," a light, creped, multilayered cellulose wadding that holds water well enough that it can be used to test even large-seeded species, such as *Quercus*, for which sand is normally prescribed. Other products, such as ground pumice, perlite, and vermiculite (expanded mica) are often used also. Combinations are possible; for example, Kimpak

below ordinary paper assures an even water supply without requiring a wick arrangement.

5.4.5 Water

The water used for germination testing, and for prechilling, should be free from impurities and have an approximately neutral reaction. Unless it is very hard, that is, high in mineral salts such as calcium and magnesium, there is no reason to use distilled water, which may need aeration to increase the oxygen content. Deionized water may give more uniform results than tap water and does not require special aeration. For comparable results the same source of water should be used at all times.

5.5 Apparatus

A large number of different types of germinator have been designed to provide, by one means or another, the conditions essential for germination — heat, light, humidity, and oxygen.

5.5.1 Open-surface germinators

The bell jar or Jacobsen apparatus, also known as the Copenhagen tank, uses a wick, usually of filter paper, to bring moisture to the seed surface. The water is supplied from an underlying reservoir, or through a variety of special channels. Water temperature largely controls the seed germination temperature; seed surface temperatures are more accurately maintained if the equipment is operated in an air-conditioned room. Seeds are suspended over the water by wide strips of glass, stainless steel, or other suitable material, the upper surface of which is lined with filter paper or other appropriate media. Humidity around the seeds is maintained by well-fitting bell jars, or inverted funnels, of clear glass or plastic. A small hole at the top allows for ventilation without undue evaporation. Light (when required) is usually provided by artificial sources suspended above the seeds.

This equipment occupies a large amount of space relative to the number of samples that can be tested at one time. Some equipment relies on a single large water reservoir that must be completely purged with fresh water at the new temperature to obtain a rapid change in temperature when an alternating regime is prescribed. More modern units employ a circulating water system that is constantly temperature conditioned, and temperature changes can be effected rapidly.

5.5.2 Cabinet germinators

Cabinet germinators are boxes in which temperature, humidity, and, to a lesser extent, lighting are automatically controlled, and in which seeds are placed in open trays or shallow boxes lined with a germination medium. Closed boxes are frequently used because this alleviates the need for close humidity control within the cabinet itself. The trays or boxes are placed on perforated shelves that span the full width and depth of the cabinet, shelf spacing being arranged to maximize the number of samples tested at one time. Germination boxes are typically made of a clear, rigid plastic, although opaque versions are available. Light is provided by artificial sources either from the sides, or the rear, of the cabinet.

The main advantage of cabinet germinators is that many more tests can be handled efficiently with less labor, and the units require less floor space than Jacobsen germinators. However, lighting is not uniform throughout the cabinet; this can be alleviated by changing the position of the boxes on the tray, or rotating the tray through 90° each time the germinants are assessed.

5.5.3 Room germinators

Room germinators are essentially cabinets large enough for the analyst to enter and place the tests on either side of a passageway. Extra attention has to be given to air movement, to maintain uniform temperatures while maintaining high relative humidity. Uniform lighting is frequently a problem in that the best use of a room germinator is made when several levels of shelves are installed to accommodate large numbers of tests. Shelves should be vertically spaced to allow lighting to be installed on the underside of each level. Room germinators can be used to test all kinds of seeds, but are more suitable for large-seeded trees such as *Aesculus*. Each container must be enclosed to control moisture loss. The use of large containers not only maximizes the use of space, but also helps to ensure that all seeds are more likely to be subjected to the same conditions. Typically, with such large-seeded species, more than one container is required to comprise each replication, so component containers should be identified as such at the beginning of the test. This avoids the temptation, after germination, to group the components so that replications fall within tolerance limits (Section 5.9).

Combinations of room and Jacobsen germinators, or room and cabinet types, may be used. These provide better temperature control, especially for alternating temperatures when the room should be maintained at the lowest temperature required.

5.6 Procedure

The pure seeds (Section 3.2) must be well mixed and 400 seeds counted at random into replications of 100, 50, or 25 seeds. The replications are obtained by repeatedly dividing the pure seeds, using an approved laboratory sampling method (Section 3.4.2), until the subsample is approximately equal to, but not less than, the desired number of seeds. The seeds are then counted at random and the surplus set aside. Counting must always be by hand and not by means of counting boards or vacuum counters, because these machines may give bias towards or against large or small seeds in the sample. These devices may be used for placement of seeds on the test substratum, however, after they have been counted. The seeds must be spaced uniformly on the moist substratum and far enough apart to prevent the seedlings, as far as possible, from touching each other before they are counted and removed.

When paper media are used, the replications are placed on top of the paper (TP), on open trays or enclosed in transparent dishes or boxes in either cabinet or room germinators, or covered by a bell jar or inverted funnel in Jacobsen germinators. When sand is used as the substratum, seeds are usually planted in a uniform layer of moist sand (S) and then covered to a depth of 10–20 mm with sand that is left loose; this procedure is prescribed for numerous broadleaved species as well as some conifers (Table 2). Other species are tested by pressing the seeds into the surface of the sand, that is, left on top of the sand (TS).

Soil, or an artificial growing mix, may be used instead of sand for procedures S and TS, although it may be more difficult to standardize. If seedlings tested on paper or sand show phytotoxic symptoms, or if their evaluation is doubtful for other reasons, the seeds must be retested using soil or a substitute artificial substratum (Sections 5.9, 5.10).

5.7 Test conditions

Permissible substrata, temperature, light conditions, and special treatments are prescribed for individual species in Table 2. Alternatives, indicated in parentheses in the table, may be used to suit the facilities at the testing laboratory, or for particular provenances and seed conditions. The alternative methods should be regarded as the less desirable test procedures.

5.7.1 Temperature

Germination temperatures prescribed in Table 2 must be determined at the level of the seeds on the substratum, and should be as uniform as possible through the germinator. The temperature indicated should be regarded as a maximum and should not vary more than $\pm 1°C$ each 24-hour period. It is expressed by one numeral when a constant temperature is to be used. Two numerals separated by a dash indicate that the seeds should be tested at an alternating temperature. The lower temperature should be maintained for 16 hours and the higher temperature for 8 hours each day. When testing seeds that are dormant, it is essential that the temperature change at the seed surface be accomplished in 1 hour or less. If alternating temperatures are not controlled over weekends or holidays the tests should be maintained at the lower temperature during these periods.

5.7.2 Light

Light must be provided as described below for all species in Table 2. The light intensity should be between 750 and 1250 lux to satisfy the requirements for light-requiring seeds. Essential structures of the germinants can be evaluated with greater certainty when the seeds are germinated under a light intensity as low as 250 lux. When seeds for which light is required are tested alongside nonphotosensitive seeds in the same germinator, the light intensity should be 750–1250 lux. Since none of the species listed in Table 2 are known to be inhibited by light, it is simpler to use a standard light intensity of 750–1250 lux for all tests.

Cool-white fluorescent lamps are to be used because they have a relatively low spectral emission in the far-red (germination-inhibiting) region and are high in the germination-promoting red region. Seeds should be illuminated for at least 8 hours in every 24, and for some species up to 16 hours of light may be beneficial, as noted under "Additional directions" in Table 2. Continuous light should not be used unless there is evidence that this does not inhibit germination. When seeds are germinated under alternating temperatures, they should be illuminated during the high temperature period.

Illumination should be as even as possible over the testing surface and heat from the lamps must not affect the prescribed temperature. Seeds should be germinated on top of the substratum to prevent differential filtering of the light before it reaches them.

5.7.3 Moisture and aeration

The substratum must contain sufficient moisture at all times to meet the requirements for germination, but it must not be excessive or aeration may be retarded. Except where a high moisture level is recommended, the substratum should never be so wet that a film of water forms around the seeds.

The initial quantity of water to be added to the substratum will depend upon its nature and dimension. Subsequent watering is left to the discretion of the analyst, but it should be avoided whenever possible as it may cause additional variation between results. The need for additional watering may be reduced if a saturated, or nearly saturated, atmosphere is maintained around the seeds which will prevent loss by evaporation. Air humidity can be increased by means of automated humidifiers, by keeping an open container of water in the chamber or cabinet, by enclosing tests on paper in dishes, or by covering sand and soil tests with moist blotters, or glass or plastic plates, until the seedlings emerge. Excessive condensation on the seedlings must be avoided.

5.7.4 Special treatments for breaking dormancy

Tree seeds can be grouped into three classes for germination testing:

(i) Rarely dormant and requiring no pretreatment.

(ii) Invariably dormant and either (a) can be tested within 2 months if the seeds have been prechilled, or (b) are so dormant that a germination test cannot be completed within 2 months. For such species quick viability tests are preferred.

(iii) Showing varying degrees of dormancy that cannot be reliably predicted. For such species, double tests with and without prechilling (Section 5.2) are necessary.

When seeds are prechilled, the prechilling period is not included in the germination test period (Section 5.7.5), but the prechilling duration and temperature should be reported. If double tests are conducted, germination of the unprechilled sample should be tested concurrently with the prechilled sample.

For some tree species, the seeds of which exhibit deep dormancy, biochemical staining tests (tetrazolium) (Section 7) or excised embryo tests are recommended. Methods for conducting excised embryo tests are described in Chapter 6 (and the annexe), and in Appendix C, respectively, of the International Seed Testing Rules, 1985.[3]

5.7.5 Duration of the test

The length of a test is prescribed in Table 2; any prechilling period is not included in the test period. If, at the end of a prescribed test period, some seeds have just begun to germinate, the test may be prolonged for an additional 7 days. A test may be terminated sooner than the prescribed time if there has been no germination for 7 days. The timing of the first count is approximate, but should permit accurate seedling evaluation; otherwise it should be omitted. Intermediate counts may be made to remove sufficiently developed seedlings, but such counts should be minimized to reduce damage to still-developing seedlings. However, seedlings may have to be counted and removed more frequently than prescribed when fungal or bacterial infections are evident. Clearly dead or decayed seeds which may be a source of contamination for healthy seedlings should be removed at each count and the number recorded.

5.8 Seedling evaluation

Every seedling must be evaluated in accordance with the prescription for normal and abnormal seedlings (Section 5.2). The stage of development of the essential structures must be sufficient to permit detection of any abnormal seedlings. It may be necessary to remove the seed coat and separate the cotyledons when the plumule is still enclosed at the end of a test. Seedling evaluation on artificial substrata is usually straightforward, but if seedlings cannot be evaluated a test should be made in sterile sand, or good quality soil, at the prescribed test temperature and with favorable light and water supply (Section 5.4.3). Another sample known to produce normal seedlings should be tested at the same time as an evaluation guide. When abnormal seedlings with phytotoxic symptoms occur in chemically treated seeds tested on artificial substrata, seedling evaluation should be checked by retesting in good quality soil or an artificial growing mix (Sections 5.4.3 and 5.6). A tree seed producing multiple seedlings as a result of polyembryony is to be counted as a single seed in the germination test.

[3] International Seed Testing Association, 1985. International rules for seed testing 1985. Seed Science and Technology 13: 299-513.

At the end of a normal germination test, the percentage of fresh, ungerminated seeds must be determined by cutting the seed along its longitudinal axis and examining the content. Those seeds that have remained firm and apparently viable should be reported as fresh, ungerminated seeds. Viability of these seeds may be determined by a tetrazolium test (Section 7).

For tree seeds, the evaluation of empty and insect-damaged seeds (Section 5.2) should be made only if requested prior to the germination test. These evaluations may be made either before or after the germination test. If done before the germination test begins, either (i) X-ray radiographs of the replications to be used in the germination test can be made, or (ii) a cutting test can be conducted on an additional four replications of 100 seeds drawn from the pure seeds (if X-ray methods are not available). In the cutting test, seeds are soaked in water at room temperature for 24–48 hours, then each seed is cut along its longitudinal axis and the content examined and classified. If done after the germination test, ungerminated seeds are cut longitudinally and the content examined and classified. Empty seeds and insect-damaged seeds are more accurately determined using either method (i) or (ii) above, before the germination test has begun.

5.9 Calculation and expression of germination results

The average of the four 100-, 50-, or 25-seed replications used in the test, calculated to the nearest whole number, are reported as the percentage germination. The range of values for the 100-seed replications must not exceed the maximum tolerated differences prescribed in Table 3.

Table 3. Maximum tolerated ranges between replications

If the average germination percentage is:	*or:*	*The maximum tolerated range[1] between replications is:*
99	2	5
98	3	6
97	4	7
96	5	8
95	6	9
93 to 94	7 to 8	10
91 to 92	9 to 10	11
89 to 90	11 to 12	12
87 to 88	13 to 14	13
84 to 86	15 to 17	14
81 to 83	18 to 20	15
78 to 80	21 to 23	16
73 to 77	24 to 28	17
67 to 72	29 to 34	18
56 to 66	35 to 45	19
51 to 55	46 to 50	20

[1] This table indicates the maximum range, that is, the difference between highest and lowest, in germination percentage tolerable between replications, allowing for random sampling variation only at 0.025 probability. To find the maximum tolerated range, calculate the average percentage of the four replications to the nearest whole number. When necessary, form 100-seed replications by combining the sub-replications of 50 or 25 seeds that were closest in the germinator. Locate the average in either of the first two columns and read the maximum tolerated range in the third column.

For large seeded species that must be tested with fewer than 100 seeds per replication (see Sections 5.5.3, 5.6), the component containers required to comprise each 100-seed replication should be identified before the test begins. If this is not done, containers immediately adjacent to one another in the germinator should be grouped together. Any temptation to manipulate replication combinations to ensure that they fall within tolerance limits (Table 3) must be resisted. If the results are out of tolerance it may be impossible to repeat the test because for such trees, for example, *Quercus*, *Aesculus* or *Castanea*, the remainder of the submitted sample may be too small (it need contain only 500 seeds — see Table 1) or may have deteriorated in storage (Section 2.7). A new sample may have to be obtained for testing in such instances.

5.9.1 Retesting

The result of a test should be considered unsatisfactory, and should not be reported, and a second test should be made by the same method or by an alternative method, when:

(a) the range of values for the 100-seed replications exceeds the maximum tolerated differences prescribed in Table 3.

(b) there is evidence that the result may not be reliable because of wrong test conditions, errors in seedling evaluation, or inaccuracies in counting or recording the results.

Table 4. Compatibility of tests

If the average germination percentage is:	*or:*	*The maximum tolerated range[1] between tests is:*
98 to 99	2 to 3	2
95 to 97	4 to 6	3
91 to 94	7 to 10	4
85 to 90	11 to 16	5
77 to 84	17 to 24	6
60 to 76	25 to 41	7
51 to 59	42 to 50	8

[1]This table indicates the tolerances to be used in deciding if two tests are compatible, allowing for random sampling variation only at 0.025 probability. To determine if two tests are compatible, calculate the average percentage germination of the two tests to the nearest whole number and locate it in either of the first two columns. The tests are compatible if the difference between the germination percentages of the two tests does not exceed the tolerance shown in the third column.

(c) there is evidence that the result may not be reliable because of dormancy, phytotoxicity, or the spread of fungi or bacteria.

In (a), if the result of the second test is compatible with that of the first, the average of both tests represents the average germination to be reported, provided the difference between the two tests does not exceed the tolerance prescribed in Table 4. If the difference between the first and second test exceeds the allowable tolerance, at least one more test must be made.

In (b), a retest should be made using the same method and the result of the retest is to be reported.

In (c), a retest should be made using one of the alternative methods indicated in Table 2, or in sand or soil. The best result achieved is to be reported together with the method used.

5.10 Reporting results

Results are expressed as a percentage of the number of seeds tested. When four 100-seed replications of a test are within the maximum tolerated range indicated in Table 3, the average, calculated to the nearest whole number, represents the percentage to be reported. Complete reporting of a germination test result includes the percentages of normal seedlings, abnormal seedlings, hard seeds, fresh ungerminated seeds, and dead seeds. If any of these categories is nil, it is reported as "-0-". The duration of the test must be reported also; if the test was extended beyond the prescribed period because some seeds had just started to germinate at the end of the test, the results obtained within the prescribed time limit must be additionally reported. If double tests (Section 5.7.4 (iii) and Table 2) are prescribed, the results of both tests are to be reported.

If a retest is conducted because the range of the 100-seed replications exceeds the maximum tolerated range indicated in Table 4, provided the second result is compatible with the first (that is, the difference between the two test averages does not exceed the tolerance indicated in Table 4) the average of the two tests is the result to be reported. If the second result is not compatible with the first, a third test using the same method must be conducted. The average of compatible results is to be reported. The report should state that a retest was performed, giving the reasons, and indicate that the percentages reported are the averages of the tests.

When alternative substrata, temperatures, or prechilling to break dormancy have been used, the particulars of the method must be reported. When the percentage of ungerminated seeds that are viable has been determined at the end of a test (Section 5.8), both the percentage and the methods are to be reported. The percentages of empty seeds and insect-damaged seeds, if determined, and the method used must also be reported.

6. *Moisture Content Determination*

6.1 Object and definition

The object is to determine the moisture content of a seed sample, which is defined as the quantity of water lost when it is dried in accordance with the following procedures. It is expressed as a percentage of the weight of the original sample.

6.2 General principles

The methods described are designed to reduce oxidation, decomposition, or the loss of other volatile substances while ensuring the removal of as much moisture as possible. The submitted sample (Section 2.5.5) must arrive at the testing laboratory in an airtight, moisture-proof and undamaged container from which as much air as possible has been excluded (Section 2.6). The test must commence as soon as possible after receipt, and exposure of the sample to the laboratory atmosphere must be minimized. For species that do not require grinding, no more than 2 minutes may elapse from the time the sample is removed from the container in which it was received until the working sample has been placed in a weighed drying container.

6.2.1 Weighing

The samples used for moisture determination are to be weighed in grams, to three decimal places.

6.2.2 Apparatus

The following apparatus is required depending upon the method used:

(a) An adjustable grinding mill constructed of nonabsorbent material. It should be designed so that both the seeds to be ground and the resulting ground material are protected from ambient air during grinding to the maximum extent possible. It should grind evenly at a speed that does not cause heating of the material being ground, and minimize air currents that might cause loss of moisture. It should be adjustable so as to obtain particles that will pass through a sieve with 4.00-mm mesh (Section 6.2.4).

(b) A constant-temperature oven, together with drying containers and a desiccator. The oven may be either a gravity-convection or a mechanical-convection (forced draught) type, electrically heated with thermostatic control, well-insulated, and capable of maintaining a reasonably uniform temperature throughout the chamber and the specified temperature at shelf level. It should be equipped with removable perforated or wire shelves and with a thermometer that has been tested to be accurate to ±0.5°C placed near the upper shelf in the vicinity of the samples. The heating capacity should be such that, after preheating to the required temperature, followed by opening and loading with containers, the oven will again reach the required temperature within 15 minutes.

The containers should be of noncorrosive metal or glass approximately 0.5 mm thick, should have snug fitting covers to minimize gain or loss of moisture, and should have sides rounded at the base, a flat bottom, and level edges. The cover and its container should have matching numbers. Before use the container should be dried for 1 hour at 130°C (or by an equivalent procedure), and cooled in a desiccator. The effective surface of the container must enable the moisture content sample to be distributed no more densely than 0.3 g/cm^2.

The desiccator should promote rapid cooling of the containers and contain a suitable desiccant (for example, phosphorus pentoxide or activated alumina).

(c) An analytical balance capable of quick weighing to 0.001 g.

(d) A wire sieve with a mesh opening of 4.00 mm.

6.2.3 Working sample

The moisture content determination must be carried out in duplicate on two independently drawn working samples weighing 4 to 5 g. The submitted sample must be thoroughly mixed before the working samples are withdrawn by a method prescribed in Section 3.4.2. The samples must not be exposed to the ambient air for more than 30 seconds.

6.2.4 Grinding

Large seeds, such as those of *Quercus* spp., must be ground before drying. Grinding must be done on a subsample before the working sample is taken. At least 50% of the ground material must pass through a sieve with a 4.00-mm mesh.

The grinding mill should be adjusted to obtain 4.00-mm particles, then a small quantity of the sample should be ground and rejected. An amount of sample slightly greater than that required for the test is then ground.

6.3 Procedure

Weigh the empty container and its cover. The working sample, drawn as prescribed in Section 3.4.2, must be evenly distributed over the surface of the container. The container and its cover are then reweighed and immediately placed, with the cover beneath the container, in an oven maintained at a temperature of 103 ± 2°C, and dried for 17 ± 1 hours.

The drying period begins at the time the oven returns to the required temperature. At the end of the prescribed drying period the cover is put on the container and then it is placed in a desiccator to cool for at least 30–45 minutes. After cooling, the container with its cover and contents are again weighed.

6.4 Calculation and expression of results

The moisture content as a percentage by weight is to be calculated to one decimal place by means of the following formula:

$$(M_2 - M_3) \times \frac{100}{M_2 - M_1}$$

where M_1 = weight (in grams) of the container and its cover; M_2 = weight of container, cover, and contents before drying; and M_3 = weight of the container, cover, and contents after drying. The difference $M_2 - M_1$ is the weight of the sample before drying, that is, its "fresh" weight. All seed moisture contents are expressed on a fresh weight basis.

The average of the duplicate determinations should be taken as the percentage moisture content of the sample, provided the difference between the two determinations does not exceed 0.3–2.5%, depending on seed size and initial moisture content. The tolerance limits are prescribed in Table 5. The test must be repeated, in duplicate, if the difference exceeds the appropriate tolerance limit. The moisture content is reported to the nearest 0.1%.

Table 5. Tolerance levels for difference between two determinations of moisture content

Seed class	*Seed size (number of pure seeds/kg)*	*Initial moisture content (%)*	*Tolerance (%)*
Small	>5000	<12	0.3
Small	>5000	>12	0.5
Large	<5000	<12	0.4
Large	<5000	12–25	0.8
Large	<5000	>25	2.5

7. *Biochemical Test for Viability*

7.1 Object

The objective of the biochemical test is to make a quick estimate of the viability of a seed sample based on the manner in which seed tissues develop a red stain when immersed in tetrazolium reagent. The test is particularly useful for seeds that are deeply dormant and for which the normal germination test would take more than 2 months. It is also used to determine the viability of individual seeds that remain ungerminated at the end of a germination test.

7.2 Definitions

Viable seeds:
Seeds that are capable of producing seedlings in a germination test after dormancy has been broken, and if diseased, after they have been properly disinfected. The tissues of such seeds stain completely, or if they stain only partly, the staining patterns as described in Table 6 indicate that they are viable.

Nonviable seeds:
Seeds that are incapable of producing seedlings. The tissues of such seeds reveal uncharacteristic coloring and/or flaccid essential structures. Seeds with abnormal development of the embryo or other essential structures must be regarded as nonviable, whether stained or not. In conifers, embryos less than half the length of the cavity within the endosperm must be regarded as nonviable.

Essential structures:
Meristems and all structures recognized as necessary for the development of a normal seedling.

Table 6. Procedures for tetrazolium tests on tree seeds

Species	*Moistening*		*Exposing tissues*	*Staining period*[3] *(h)*	*Evaluation preparation*	*Max. allowable area of unstained, flaccid or necrotic tissue*[4]	*Remarks*
	Method[1]	*Time*[2] *(h)*					
Abies, Larix, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Taxus, Tsuga spp.	W	18–24	1. Cut both ends transversely, removing fragments of endosperm. 2. Cut longitudinally beside embryo.	8–24 except *Taxus* 24–48	1. Cut longitudinally through endosperm to expose embryo. Remove seedcoat. 2. Cut longitudinally through embryo.	None, including the endosperm.	Old and dry seeds may give more consistent results if soaked 48 hours; use of fungicide may aid evaluation; embryos shorter than ½ embryo cavity are not viable.
Acer rubrum	1. W	18–24	1. Remove seedcoat.	15–20		Radicle tip, ⅓ distal area of cotyledons; if superficial necrosis occurs, up to ½ cotyledons may be accepted.	
	2. S	Prechill 10–14 days at 3–5°C.	2. Remove pericarp and seedcoat.				Prechilling preferred for old and dry seeds.
Chamaecyparis nootkatensis	W	18–24	1. Cut transversely ¼ from distal end. 2. Cut longitudinally beside embryo.	24	Cut longitudinally through embryo and remove seedcoat.	None, including the endosperm.	
Fraxinus spp.		Remove pericarp and wing.	Cut approximately 0.5 mm along both edges.	16–24	Split endosperm in half to expose embryo.	None, except small necroses on endosperm away from the embryo.	
	W	18–24					

[1] Moistening in water (W) or in wet sand (S).
[2] At room temperature (20–25°C).
[3] At 30°C, using a 1.0% solution.
[4] The whole structure has to be considered, so if a portion is removed during preparation before staining, it is regarded as fully stained or as part of the maximum area that can be unstained.

Well developed and differentiated embryos and endosperms may have the ability to repair small necroses. Superficial necrosis, of limited extent, may be tolerated even within essential tissues, therefore.

7.3 General principles

A solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride or bromide, which is a pale straw-yellow color, is used as an indicator to reveal the reduction processes taking place within cells. When imbibed by living tissues it is reduced, that is, it accepts hydrogen released by the action of dehydrogenase enzymes, and it is converted into a stable and non-diffusable triphenyl formazan which stains the tissues red. Dead cells or tissues do not reduce the solution so they remain colorless. This makes it possible to distinguish living (red colored) parts of seeds from dead areas. The test is a topographical staining test.

Some seeds stain completely while others remain completely unstained. Partially stained seeds may also occur, indicating that varying portions of necrotic tissue are present. The position and size of the necrotic areas in the embryo and endosperm (or gametophyte) tissues primarily determine whether such seeds are classified as viable or nonviable.
Color intensity is of secondary importance, but, together with tissue firmness or flaccidity, can aid the recognition and location of sound, weak, or dead tissues.

7.4 Materials

A 1.0% aqueous solution of tetrazolium chloride or bromide, with a pH range of 6.5–7.5, is used. If the distilled water does not permit a pH within this range, the solution must be buffered. The buffer solution is prepared as follows.

Dissolve 9.078 g KH_2PO_4 in 1000 mL of distilled water. Dissolve either 9.472 g NaH_2PO_4, or 11.876 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, in another 1000 mL of distilled water. Combine two parts of the KH_2PO_4 solution with three parts of the Na_2HPO_4 (or $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) solution. Dissolve 1 g of tetrazolium salt in 100 mL of this buffer solution to obtain a 1.0% reagent.

7.5 Procedure

7.5.1 Working sample

When a biochemical test is carried out in lieu of a germination test, four replications of 100 seeds each are drawn from the pure seed fraction (Section 3.2) as for the germination test (Section 5.6). The test may also be carried out on individual seeds that remain ungerminated at the end of a germination test.

7.5.2 Preparation of the seeds before staining

The seeds must be prepared to facilitate penetration of the tetrazolium solution using the following steps.

(i) Seeds are immersed in water at room temperature and left to soak for 18–24 hours. The water is then drained off.

(ii) Exposure of the tissues allows easier penetration of the tetrazolium solution and facilitates evaluation. In conifers this is accomplished either by longitudinally cutting the seeds through the endosperm, parallel to but not touching the embryo, or by transversely cutting from both ends of the seeds a small fraction big enough to ensure that the inner seed coat is broken but without causing major injury to the embryo. For broadleaved species, tissue exposure is obtained by removal of the pericarp and by slicing a portion from the seed margins as indicated in Table 6.

When the viability of fresh seeds is determined at the end of a germination test, these preparation steps are unnecessary since the seeds will be completely hydrated and they will have been sliced longitudinally along their axes for examination of their contents (Section 5.8). Such seeds can be placed directly into the tetrazolium reagent.

7.5.3 Staining

The seeds must be completely covered by the tetrazolium solution and placed in a light-proof enclosure for the period specified in Table 6. Exposure to light will cause a reduction of the tetrazolium solution, whether or not the seeds are viable.

If the tissues are incompletely stained, the staining period may be prolonged to verify that the lack of coloration is due to slow uptake of the reagent, rather than due to defects within the seeds. Overstaining should be avoided as this may obscure differential staining patterns indicative of weak seeds, or damage due to freezing or other causes.

At the end of the staining period the seeds should be removed from the tetrazolium reagent and rinsed two or three times in distilled water.

7.5.4 Preparation for evaluation

Depending upon the method used to expose the tissues prior to staining, the seeds will require further preparation as specified in Table 6, so that a proper evalua-

tion can be made. This allows separation of the embryo and endosperm tissue. In most instances, further preparation is not necessary when examining fresh seeds at the end of a germination test, because the seed structures are easily separable.

7.5.5 Evaluation

Each seed in a sample must be examined and evaluated as viable or nonviable on the basis of staining pattern and tissue soundness. Only completely stained seeds, or those with acceptable nonstained areas, are to be evaluated as viable. Tissue flaccidity of essential structures, even when staining is complete, must be regarded as an indicator of nonviability.

Specific directions for evaluation are listed in Table 6.

The analyst should be aware that cut surfaces do not stain very well, but acquire a dark, silvery appearance. Only uncut surfaces of embryos and endosperm tissues should be evaluated, therefore. This is especially important when evaluating fresh seeds at the end of a germination test since the embryos may have been sliced longitudinally.

7.6 Calculation and expression of results

The number of seeds considered viable must be determined for each replication in the test (Section 7.4.1) and the average percentage, based on all the replications and calculated to the nearest whole number, is then determined. The result of a test must be considered unsatisfactory if the range of values for the 100-seed replications exceeds the maximum tolerated differences prescribed in Table 3.

7.7 Reporting results

The result is to be reported in the following manner:

Tetrazolium test: . . .% of the seeds are viable.

Further details may be provided at the discretion of the testing laboratory and may include percentage empty, with insect larvae, broken or decayed seeds. When individual seeds are tested at the end of a germination test, the results are to be reported in accordance with Section 5.10.

Acknowledgments

The advice and guidance of Mr. B.S.P. Wang (Canadian Forestry Service, Petawawa National Forestry Institute) and the technical assistance of Mr. D.W. Taylor (Canadian Forestry Service, Pacific Forestry Centre) are acknowledged.

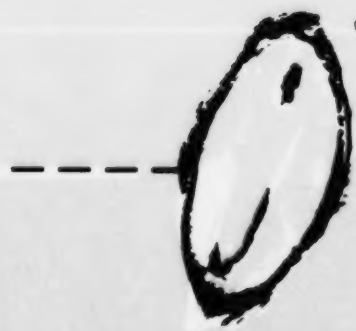
Méthodes de contrôle

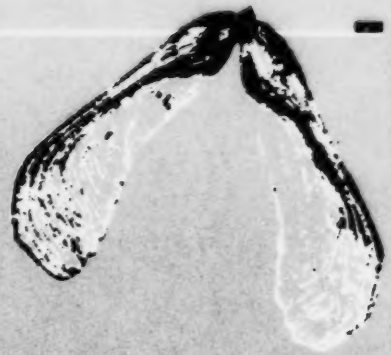
DES · SEMENCES · FORESTIÈRES

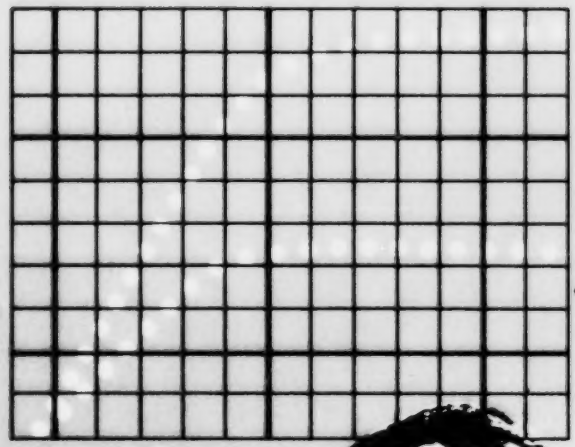
au Canada

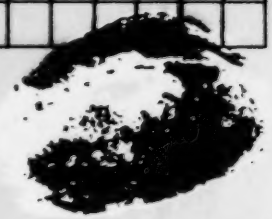
D.G.W. Edwards

Rapport
technique de
foresterie 36









Canada

Méthodes de contrôle

DES · SEMENCES · FORESTIÈRES

au Canada

Rapport
technique de
foresterie 36

D.G.W. Edwards

Centre de foresterie du Pacifique
506, West Burnside Road
Victoria (Colombie-Britannique)

Service canadien des forêts
Gouvernement du Canada
Ottawa
1987

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1987
Numéro de catalogue Fo64-36/1987
ISBN 0-662-55446-9

Des exemplaires de cette publication peuvent être obtenus sans frais à l'une des adresses suivantes:

Direction des communications
Place Vincent-Massey, 3e étage
Hull (Québec)
K1A 1G5

Centre de foresterie du Pacifique
506, West Burnside Road
Victoria (Colombie-Britannique)
V8Z 1M5

Une édition sur microfiche de cette publication peut être achetée à l'adresse suivante:

Micromedia Ltée
158, rue Pearl
Toronto (Ontario)
M5H 1L3

Table des matières

Résumé 5

Préface 6

1. Introduction 7

1.1 But du contrôle des semences 7

1.2 Rôle du contrôleur 7

1.3 Utilité de l'uniformisation des méthodes de contrôle 7

2. Échantillonnage 8

2.1 Généralités 8

2.2 Principes généraux 8

2.3 Définitions 8

2.4 Le lot de semences 8

2.5 Échantillonnage d'un lot de semences 9

2.5.1 Instructions générales 9

2.5.2 Instruments et méthodes d'échantillonnage 9

2.5.3 Nombre d'échantillons à prélever 11

2.5.4 Prélèvement 11

2.5.5 Poids de l'échantillon d'analyse 11

2.6 Transport des échantillons 12

2.7 Conservation des échantillons 12

2.7.1 Avant les analyses 12

2.7.2 Après les analyses 12

2.8 Échantillonnage au laboratoire 12

2.9 Identification et scellement du lot 12

2.9.1 Instructions générales 12

2.9.2 Méthodes d'identification et de scellement 13

3. Contrôle de la pureté 14

3.1 But 14

3.2 Définitions 14

3.3 Ailes et téguments 14

3.4 Méthodes d'analyse 14

3.4.1 Échantillons de travail 14

3.4.2 Échantillonnage au laboratoire 14

3.4.3 Séparation pour l'évaluation de la pureté 15

3.4.4 Pesée, calculs et présentation des résultats 16

4. Détermination du poids des graines 17

4.1 But 17

4.2 Méthode 17

4.2.1 Comptage de doubles 17

4.2.2 Calculs et présentation des résultats 17

5. Évaluation de la faculté germinative 18

5.1 But 18

5.2 Définitions 18

5.3 Principes généraux 19

5.4 Matériel 19

5.4.1 Papier 19

5.4.2 Sable 22

5.4.3 Terre 22

5.4.4 Autres substrats 22

5.4.5 Eau 23

5.5 Appareils 23

5.5.1 Germoirs ouverts 23

5.5.2 Cabinets de germination 23

5.5.3 Chambres de germination 23

5.6 Méthode 24

5.7 Conditions de germination 24

5.7.1 Température 24

5.7.2 Éclairage 24

5.7.3 Humidité et aération 25

5.7.4 Traitements spéciaux pour interrompre la dormance 25

5.7.5 Durée de l'épreuve 25

5.8 Évaluation des plantules 26

5.9 Calculs et présentation des résultats de l'épreuve de germination 26

5.9.1 Reprise d'une épreuve 26

5.10 Résultats figurant au rapport 28

6. Détermination de la teneur en humidité 29

6.1 But et définition 29

6.2 Principes généraux 29

6.2.1 Pesée 29

6.2.2 Appareils 29

6.2.3 Échantillon de travail 29

6.2.4 Broyage 29

6.3 Méthode 30

6.4 Calculs et présentation des résultats 30

7. Évaluation de la viabilité par voie biochimique 31

7.1 **But** 31

7.2 **Définitions** 31

7.3 **Principes généraux** 31

7.4 **Matériel** 31

7.5 **Méthode** 31

7.5.1 Échantillon de travail 31

7.5.2 Préparation des graines 31

7.5.3 Coloration 33

7.5.4 Préparation pour l'évaluation 33

7.5.5 Évaluation 33

7.6 **Calculs et présentation des résultats** 33

7.7 **Résultats figurant au rapport** 33

Remerciements 34

Liste des tableaux

Tableau 1. Poids des lots de semences forestières et des échantillons à prélever pour l'évaluation de la pureté et de la faculté germinative 9

Tableau 2. Conditions prescrites pour l'évaluation de la faculté germinative des semences forestières 20

Tableau 3. Différences maximales acceptables entre les doubles 27

Tableau 4. Comptabilité des résultats de plusieurs épreuves 27

Tableau 5. Différences acceptables entre les résultats de deux mesures de la teneur en humidité 30

Tableau 6. Méthodes d'évaluation des semences forestières par l'épreuve au tétrazolium 32

Résumé

Ce manuel décrit des méthodes normalisées pour échantillonner les semences forestières et en évaluer la pureté, la faculté germinative, la teneur en humidité et le poids unitaire. Il a été préparé en vue de l'application de la réglementation sur les semences forestières qu'on projetait d'ajouter à la Loi relative aux semences. Le gouvernement fédéral souhaitant réduire la réglementation, le projet a été abandonné. Néanmoins, il demeure utile de connaître des méthodes uniformes et normalisées pour contrôler les semences forestières. On prévoit revoir le manuel pour l'adapter aux nouvelles techniques qui seront mises au point dans le domaine.

Préface

Depuis l'adoption d'une loi sur le contrôle des semences, en 1905, le Parlement a le pouvoir de réglementer la qualité et la vente des semences au Canada. Cette loi et les règlements qui l'accompagnent ont fait l'objet de plusieurs révisions, mais la question des semences forestières n'a jamais été abordée. En 1977, on a incorporé une définition où on traitait expressément des semences forestières à la Loi relative aux semences, mais les règlements, préparés spécifiquement pour les cultures agricoles, n'ont pas été modifiés et sont impropres en ce qui a trait aux produits de foresterie.

Au Canada, l'emploi des semences forestières fait l'objet d'un contrôle à divers degrés, tout dépendant des besoins et des ressources des provinces et des territoires. Chacun des ministères provinciaux ou territoriaux dont la compétence touche la foresterie doit veiller à ce que l'utilisation des semences et des sources de semences se fasse à bon escient dans son territoire. En séance plénière, les participants de l'Atelier national sur la production de semences forestières et sur l'amélioration des essences forestières au Canada[1] ont recommandé que le Service canadien des forêts (SCF) soit investi, par délégation, du pouvoir de certification et de réglementation des semences forestières en vertu de la Loi relative aux semences. Pour se préparer à exercer ce nouveau pouvoir, le SCF a préparé un projet de réglementation sur les échanges de semences interterritoriaux. Dans ces règlements, conçus pour assurer la régénération des forêts, on énonçait les règles élémentaires de l'étiquetage et on prévoyait l'organisation de services chargés de déterminer l'origine et la qualité des semences, la surveillance des transports de semences sur de grandes distances et l'élimination des importations indésirables. Ces règlements ont encore raison d'être, mais la politique actuelle du gouvernement fédéral étant de réduire la réglementation, les propositions du SCF ne reçoivent plus d'appui.

Quoi qu'il en soit, si les règlements proposés avaient été incorporés à la Loi relative aux semences, ce manuel y aurait figuré en annexe. Dans cet ouvrage, nous décrivons des normes uniformisées régissant le contrôle de la qualité physique des semences forestières au Canada, normes dont l'application pourrait être fort salutaire pour la régénération et la production forestières. Il n'a plus de valeur réglementaire, mais il reste néanmoins utile pour tous ceux qui s'intéressent à la régénération des forêts.

Dans les pages qui suivent, nous verrons en détail les normes de contrôle recommandées. Nous prévoyons revoir les méthodes afin qu'elles soient toujours adaptées aux produits auxquels elles s'appliquent et qui, de par leur nature même, évoluent constamment. Ainsi, lorsque de nouvelles techniques de contrôle plus précises et plus fiables seront mises au point, elles viendront prendre leur place dans cet ouvrage.

[1]Morgenstern, E.K.; Carlson, L.W., (responsables). 1979. Tree seed production and tree improvement in Canada – Research and Development Needs 1977-1987. Environ. Can., Serv. can. for. Rapp. d'inf. PS-X-74.

1. *Introduction*

1.1 But du contrôle des semences

Lorsqu'on produit des plants à partir de graines, on redoute avant tout que les semences employées soient de mauvaise qualité. Par le contrôle des semences, on vise principalement à réduire ce danger le plus possible, en évaluant la qualité des graines avant l'ensemencement au moyen de méthodes normalisées. Lorsqu'on parle de «qualité des semences», on pense aux nombreux attributs qui présentent de l'intérêt pour le producteur, le transformateur, le marchand, le pépiniériste et l'organisme qui veille à la certification ou au contrôle des semences. Quel que soit le point de vue, on cherche en fin de compte à déterminer la valeur des semences pour la culture. Les méthodes décrites ici ont été conçues pour la réalisation des analyses que nécessite l'application de la Loi relative aux semences et des règlements qu'on a proposés sur les semences forestières.

1.2 Rôle du contrôleur

Le contrôleur doit se rappeler que le but essentiel du contrôle est de déterminer la valeur des semences pour la culture. Les graines étant des organismes vivants, leur comportement n'est pas aussi facile à prévoir que celui des substances inertes ou non biologiques. Les méthodes d'évaluation employées doivent s'appuyer sur les connaissances scientifiques qu'on possède sur les semences et sur l'expérience qu'ont acquise les contrôleurs; elles doivent aussi être compatibles avec les normes et les techniques établies.

1.3 Utilité de l'uniformisation des méthodes de contrôle

Les semences qui sont envoyées dans d'autres provinces ou territoires, de même que celles qui sont importées au Canada ou exportées à l'étranger, peuvent faire l'objet de contrôles dans différents laboratoires. Il est essentiel que les analyses soient réalisées suivant des méthodes normalisées afin que les résultats soient comparables dans une mesure acceptable. Nous avons décrit ici les méthodes qu'il faut suivre pour assurer l'uniformité des analyses.

2. *Échantillonnage*

2.1 Généralités

Lorsqu'on fait l'échantillonnage, on vise essentiellement deux buts. Premièrement, il s'agit de constituer un échantillon adéquat pour le contrôle. Deuxièmement, il faut faire en sorte que les composants de cet échantillon soient représentatifs de la nature et des proportions des divers types de graines que contient le lot échantillonné. Ce dernier objectif est le plus important.

La quantité de graines analysée au laboratoire est très petite par comparaison au lot que l'échantillon est censé représenter. Quelle que soit la précision du contrôle, celui-ci nous renseigne uniquement sur la qualité de l'échantillon même. Cette restriction vaut pour toutes les épreuves, autant celles qui servent à évaluer la pureté, la faculté germinative, le poids et la teneur en humidité des semences, que les radiographies et autres analyses.

L'échantillonnage des semences forestières pose souvent des problèmes du fait que les lots renferment bien souvent une forte proportion de graines vaines. Chez certains genres de conifères comme *Abies* et *Larix*, il arrive souvent que les graines vaines se remplissent de tissus ligneux qui leur confèrent une densité semblable à celle des graines viables, de sorte qu'il est difficile de les séparer à l'étape du traitement. Même si l'on brasse le lot pour le rendre homogène, on sait par expérience qu'il est diffile d'obtenir des échantillons représentatifs lorsqu'il y a une grande proportion de graines vaines. Le cas échéant, deux conséquences peuvent s'ensuivre: il se peut que (i) la qualité (quelle que soit la manière dont on l'évalue) de l'échantillon ne représente pas celle du lot dans son ensemble ou que (ii) la variation entre les doubles soit si grande que les résultats en soient inutilisables. Lorsqu'on fait l'échantillonnage, il faut se rappeler que durant le traitement les graines vaines et les ailes brisées (impuretés) ont tendance à remonter vers le haut de la masse de semences.

Il faut donc veiller à ce que le protocole d'échantillonnage soit toujours bien suivi. Les techniques d'analyse radiographique permettent de détecter les graines vaines et d'analyser divers autres caractères. Même s'il n'y a pas de graines vaines, d'autres facteurs peuvent rendre une partie du lot impropre à la culture. L'échantillon *doit* permettre de le constater. On ne saurait trop insister sur le fait que malgré toute la précision de l'analyse, celle-ci ne nous renseigne que sur la qualité de l'échantillon même. Il faut donc faire tout son possible pour que l'échantillon analysé représente vraiment la composition du lot de semences dont il a été tiré.

2.2 Principes généraux

Pour constituer un échantillon, on prélève au hasard de petites portions de graines à différents endroits dans le lot à contrôler, puis on les réunit. On divise l'échantillon ainsi obtenu en sous-échantillons, opération qui se réalise en une ou plusieurs étapes. À chaque étape, les graines sont bien mélangées; cette opération est suivie *soit* d'une subdivision progressive, *soit* du prélèvement au hasard de portions qui sont ensuite réunies.

2.3 Définitions

Lot :
quantité de graines spécifique, physiquement reconnaissable. Il peut s'agir d'un lot, ou lot de semences, de petit volume qui n'occupe qu'un seul contenant, ou d'un lot de grand volume qui est réparti dans plusieurs contenants.

Échantillon primaire :
petite quantité de semences prélevée en un point du lot.

Échantillon composite :
échantillon constitué en mélangeant ensemble tous les échantillons primaires tirés d'un lot. L'échantillon composite est généralement beaucoup plus volumineux qu'il n'est nécessaire pour les diverses analyses à réaliser (section 2.5.4); le cas échéant, il faut le réduire.

Échantillon d'analyse :
échantillon envoyé au centre d'analyse. Il est constitué d'une partie de l'échantillon composite.

Échantillon de travail :
échantillon réduit tiré de l'échantillon d'analyse pour l'une des épreuves à réaliser.

2.4 Le lot de semences

Pour le commerce international des semences forestières, le volume maximal (plus ou moins 5 %) du lot de semences a été fixé à 1 000 kg pour la plupart des essences (tableau 1). Cette limite est recommandée pour toutes les transactions. Lorsque le poids d'un lot dépasse la valeur maximale recommandée, il faut diviser celui-ci en portions dont le poids ne dépasse pas la valeur maximale prescrite et identifier chacune d'entre elles.

Le lot de semences doit être aussi uniforme que possible et, au moment de l'échantillonnage, il ne doit y avoir aucun signe

Tableau 1. Poids des lots de semences forestières et des échantillons à prélever pour l'évaluation de la pureté et de la faculté germinative

Espèce	*Poids maximal du lot (× 1000 kg)*	*Poids minimal des échantillons*	
		Échantillon d'analyse (g)	*Échantillon de travail pour l'évaluation de la pureté (g)*
Abies amabilis (Dougl. ex Loud.) Forb.	1	200	100
Abies balsamea (L.) Mill.	1	240	120
Abies grandis (Dougl. ex D. Don) Lindl.	1	100	50
Abies lasiocarpa (Hook.) Nutt.	1	70	35
Acer rubrum L.	1	100	50
Acer saccharinum L.	1	1000	500
Acer saccharum H. Marsh.	1	360	180
Aesculus hippocastanum L.	5	> 500 graines	> 500 graines
Alnus rubra Bong.	1	15	2
Betula papyrifera H. Marsh.	1	10	3
Chamaecyparis nootkatensis (D. Don) Spach	1	25	10
Fraxinus spp.	1	400	200
Larix laricina (Duroi) K. Koch	1	25	10
Larix occidentalis Nutt.	1	25	10
Picea abies (L.) Karst.	1	40	20
Picea engelmannii Parry ex Engelm.	1	25	9
Picea glauca (Moench) Voss	1	25	5
Picea mariana (Mill.) B.S.P.	1	25	3
Picea rubens Sarg.	1	25	9
Picea sitchensis (Bong.) Carr.	1	25	6
Pinus albicaulis Engelm.	1	700	350
Pinus banksiana Lamb.	1	25	9
Pinus contorta Dougl. ex Loud.	1	25	9
Pinus flexilis James	1	500	250
Pinus monticola Dougl. ex D. Don	1	90	45
Pinus nigra Arnold	1	100	50
Pinus ponderosa Dougl. ex P. et C. Lawson	1	200	100
Pinus strobus L.	1	90	45
Pinus sylvestris L.	1	40	20
Populus spp.	1	5	2

d'hétérogénéité, quant à la grosseur et à la couleur des graines ou à la nature et à l'abondance des impuretés, dans un même contenant et entre les différents contenants. On suppose généralement que le lot est uniforme, à moins qu'il n'y ait des différences évidentes; le cas échéant, l'échantillonnage ne peut se faire tant que le marchand n'a pas mélangé le lot de façon satisfaisante.

2.5 Échantillonnage d'un lot de semences

2.5.1 Instructions générales

Le marchand (ou le propriétaire des semences) doit veiller à ce que le lot à échantillonner soit accessible et que tous les contenants d'un même lot soient rassemblés ensemble. Pour que l'échantillon soit représentatif, il faut prélever des portions égales dans toutes les parties de la masse de graines. L'échantillonnage doit être réalisé par des personnes dûment formées, qui possèdent de l'expérience, et qui sont employées ou qui ont été choisies par le laboratoire pour leur compétence en la matière. Le marchand peut aussi envoyer lui-même un échantillon pour le faire analyser; le cas échéant, les résultats des analyses ne doivent s'appliquer qu'à cet échantillon, non au lot en entier.

2.5.2 Instruments et méthode d'échantillonnage

Dans la mesure du possible, l'échantillonnage des semences fluantes doit se faire par l'une des deux méthodes décrites ci-après.

a) Échantillonnage à la canne sonde ou canne à manchon

Cet instrument se compose d'un tube qui s'insère dans un manchon à bout pointu. Chadun de ces deux éléments est garni de fentes latérales qui, lorsqu'elles sont su-

Tableau 1. Poids des lots de semences forestières et des échantillons à prélever pour l'évaluation de la pureté et de la faculté germinative

Espèce	*Poids maximal du lot (× 1000 kg)*	*Poids minimal des échantillons*	
		Échantillon d'analyse (g)	*Échantillon de travail pour l'évaluation de la pureté (g)*
Pseudotsuga menziesii (Mirb.) Franco	1	60	30
Quercus spp.	5	> 500 graines	> 500 graines
Salix spp.	1	5	2
Taxus spp.	1	320	160
Thuja plicata Donn ex D. Don	1	10	3
Tsuga canadensis (L.) Carr.	1	25	7
Tsuga heterophylla (Raf.) Sarg.	1	10	4
Tsuga mertensiana (Bong.) Carr.	1	10	4

perposées les unes aux autres, laissent passer les graines dans le tube. Si l'on fait tourner le tube d'un demi-tour, après l'avoir inséré dans le manchon, les fentes sont obturées. Il existe différentes grosseurs de cannes sondes; pour faire le prélèvement, on peut les introduire à la verticale ou à l'horizontale. On préfère l'insertion à la verticale lorsque les graines à échantillonner se trouvent dans des boîtes ou dans un autre type de contenant à parois rigides, tandis que l'insertion à l'horizontale sert à l'échantillonnage des graines ensachées dans des sacs de tissu. Le tube de la canne sonde qui s'insère à la verticale doit être compartimenté, sinon, comme ce sera surtout les graines du dessus qui y tomberont, les couches supérieures seront surreprésentées dans l'échantillon.

La canne sonde, fermée, s'insère à la diagonale dans le contenant jusqu'à ce qu'elle atteigne les couches inférieures. Il ne faut pas la pousser jusqu'au fond du contenant, surtout si les graines sont dans des sacs de plastique placés dans un boîte de carton. On ouvre ensuite la canne sonde en tournant le tube d'un demi-tour, puis on secoue légèrement pour que chaque compartiment se remplisse. On retire ensuite la canne sonde, et les graines qu'elle contient sont versées dans un récipient ou sur une feuille de papier. Il faut fermer la canne sonde délicatement pour éviter que les graines coincées entre les deux cylindres ne soient abîmées.

Les graines ainsi prélevées constituent l'échantillon primaire. Si le lot de semences est réparti dans plusieurs contenants, il faut prélever plusieurs échantillons primaires comme on l'explique dans la section 2.5.3.

La canne sonde convient surtout à l'échantillonnage des lots de volume moyen ou élevé. Pour les petits (quelques kilogrammes seulement) qu'il est impossible d'échantillonner avec la canne sonde, il faut recourir à d'autres moyens, par exemple employer un séparateur de terre ou faire l'échantillonnage à la main.

b) Séparateur de terre

Le séparateur de terre, conçu à l'origine pour l'échantillonnage des sols, se compose d'une trémie à laquelle sont reliées des goulottes montées dans un cadre; à cela s'ajoute deux cuves réceptrices et une cuve de chargement. Les goulottes ont le fond incliné, de sorte que les graines qui y tombent sont envoyées d'un côté ou de l'autre de la trémie; elles sont disposées en ligne droite, en alternance selon leur inclinaison. Certains modèles comportent une vanne qu'il faut ouvrir pour que les graines s'écoulent. D'autres comportent des goulottes dont on peut régler la largeur de sorte que la machine peut servir à échantillonner des graines de différentes grosseurs. On obtiendra des résultats satisfaisants, quel que soit le modèle utilisé, en suivant les instructions données ci-après :

i) Fermer la vanne (s'il y a lieu) et verser les graines dans la trémie en veillant à les distribuer uniformément sur toute la longueur.

ii) Une fois les cuves réceptrices installées, ouvrir la vanne de la trémie complètement de façon que les graines puissent s'écouler peu à peu. Pour que la répartition se fasse bien, il faut ouvrir la vanne largement afin qu'il ne tombe pas plus de graines dans une cuve que dans l'autre.

La quantité de graines versée dans la trémie est ainsi séparée en deux moitiés représentatives qui se retrouvent chacune dans une cuve réceptrice.

Pour mélanger les échantillons, on peut faire passer les graines trois ou quatre fois (pas plus pour ne pas endommager les graines fragiles) dans le séparateur en reversant chaque fois dans la trémie les deux portions re-

cueillies dans les cuves réceptrices. Après le brassage, l'échantillon est de nouveau divisé en deux portions : l'une est remise dans le contenant, l'autre est encore divisée. On répète cette opération jusqu'à ce que le poids de chacune des portions recueillies soit à peu près égal, mais non inférieur, à la valeur prescrite pour l'échantillon d'analyse (tableau 1). Comme le séparateur est généralement réservé à l'échantillonnage des lots trop petits pour qu'on puisse employer une canne sonde, on verse le lot en entier dans la machine. Avec cette méthode, on obtient l'échantillon d'analyse directement.

c) Échantillonnage à la main

Lorsqu'on n'a pas d'échantillonneur mécanique ou que les graines ne sont pas fluantes, on peut faire l'échantillonnage à la main. Pour ce faire, on insère la main dans le contenant jusqu'à la profondeur appropriée, en gardant les doigts joints et bien droits, puis on les referme pour prélever une poignée de graines. On reprend cette opération en divers points du contenant. Si celui-ci mesure plus de 40 cm de profondeur, on peut le vider, entièrement ou partiellement, pour échantillonner les couches du fond.

2.5.3 Nombre d'échantillons à prélever

Il arrive parfois que le contenant soit très grand, par exemple s'il s'agit d'un wagon ou de la cale d'un cargo, mais c'est rarement le cas avec les semences forestières. Lorsqu'on échantillonne des semences en vrac, il faut prélever au moins 3 échantillone primaires dans les lots qui peuvent peser jusqu'à 50 kg, et au moins 5 dans les lots de 51 à 500 kg; dans les lots de plus de 500 kg à 3 000 kg, il faut prélever 1 échantillon primaire par portion de 300 kg, et 5 au minimum, et dans les lots de plus de 3 001 kg, il faut en prélever 1 par portion de 500 kg et 10 au maximum.

Les plus souvent, les semences forestières sont mises en contenants; en général, un marchand emploie toujours des contenants de même forme et de mêmes dimensions. Quelle que soit leur capacité, s'il y a 1 à 5 contenants, il faut tous les échantillonner et, en tout, prélever au moins 5 échantillons primaires. S'il y a 6 à 30 contenants, on en échantillonne 1 sur 3 et au minimum 5. S'il y a 31 contenants ou plus, on en échantillonne 1 sur 5 et au minimum 10.

S'il n'y a pas beaucoup de contenants, il se peut que les échantillons primaires, une fois réunis, ne forment pas un échantillon composite suffisant et qu'il soit nécessaire d'échantillonner les contenants plus d'une fois. Pour que les contenants soient également représentés dans l'échantillon composite, il faut que tous soient échantillonnés le même nombre de fois. Avec l'expérience, l'échantillonneur finit par connaître le poids de graines retirées par un prélèvement à la canne sonde selon le type de semences échantillonnées, et il peut dire à l'avance combien d'échantillons primaires il faut prélever dans chaque contenant. Il vaut mieux en prélever trop que pas assez.

Parfois, les graines ont été placées dans des petits contenants de différentes capacités. Le cas échéant, on doit en combiner un certain nombre de façon à obtenir un poids total de 100 kg au plus; par exemple, on peut prendre 20 contenants de 5 kg chacun ou 33 contenants de 3 kg chacun. Chaque masse de 100 kg ainsi constituée est considérée comme étant un "contenant", et le nombre d'échantillons à prélever est déterminé suivant les indications données précédemment.

2.5.4 Prélèvement

Quelle que soit la méthode d'échantillonnage employée, il faut prélever des échantillons primaires de poids à peu près égal dans chaque contenant échantillonné ou dans chaque partie à échantillonner dans un contenant ou dans une masse de graines en vrac. Dans le cas des graines en contenants, on choisit dans le lot au hasard les contenants à échantillonner et on prélève les échantillons primaires dans le haut, au milieu et dans le bas; il n'est cependant pas nécessaire de faire plus d'un prélèvement dans un contenant donné. Les échantillons primaires, pourvu qu'ils paraissent uniformes, sont réunis et mélangés pour former l'échantillon composite. Pour préparer l'échantillon d'analyse, on réduit l'échantillon composite au poids approprié suivant une méthode approuvée; la plupart du temps, le séparateur de terre fait l'affaire. S'il est difficile de faire le mélange et la réduction au poste d'échantillonnage, on peut envoyer l'échantillon composite en entier au laboratoire où on veillera à le réduire. Si l'échantillon composite est d'un poids acceptable, on peut l'utiliser tel quel comme échantillon d'analyse, sans le réduire.

2.5.5 Poids de l'échantillon d'analyse

Le contrôle des semences forestières comporte essentiellement deux sortes d'analyses qui nécessitent des échantillons de poids différents.

Si l'échantillon doit servir à la détermination de la teneur en humidité, il faut envoyer au moins 50 g de graines au laboratoire. Dans le cas de certaines essences comme *Fagus* (hêtre) et *Quercus* (chêne), il faut 100 g de graines, car il faut les broyer pour cette analyse.

Pour les échantillons servant à l'évaluation de la pureté et de la faculté germinative, on donne au tableau 1 le poids minimal nécessaire selon l'espèce.

2.6 Transport des échantillons

Si l'échantillon doit servir à la détermination de la teneur en humidité, il *faut* le placer dans un contenant étanche et fermer celui-ci en expulsant autant d'air que possible. En général, une enveloppe de papier dans un sac de plastique à fermeture hermétique fait l'affaire.

Lorsque l'échantillon doit servir à l'évaluation de la pureté et de la faculté germinative, il faut aussi le placer dans un contenant étanche s'il provient d'un lot partiellement déshydraté entreposé au sec. C'est le cas des graines de conifères dont on abaisse la teneur en eau à moins de 10 % pour l'entreposage. Dans tous les autres cas, et en particulier dans celui des graines d'essences feuillues pour lesquelles la déshydratation n'est pas indiquée, les contenants étanches sont à exclure pour le transport des échantillons qui doivent servir à l'évaluation de la faculté germinative.

Quel que soit l'usage qu'on veut faire des échantillons, il faut les emballer de façon qu'ils ne s'abîment pas durant le transport. Il faut les envoyer sans délai au laboratoire et ne jamais les laisser au propriétaire du lot ou à la personne qui demande l'analyse, ni à quelqu'un n'ayant pas l'autorisation du service d'échantillonnage.

2.7 Conservation des échantillons

2.7.1 Avant les analyses

Autant que possible, il faut commencer les analyses le jour même où l'échantillon est arrivé. Si la chose est impossible, il faut le réfrigérer à une température se situant entre 1 et 3°C (non le geler), pour que la qualité des graines change le moins possible. Les grosses graines comme celles de *Quercus*, d'*Aesculus* et de *Castanea* se conservent plus difficilement à cause de leur forte teneur en humidité.

2.7.2 Après les analyses

Les échantillons d'analyse doivent être gardés un an au laboratoire à compter de la date où le rapport d'analyse a été produit. Il faut les conserver dans des conditions telles que la qualité des graines change le moins possible; le laboratoire de contrôle n'est cependant pas responsable des changements qui peuvent se produire. En procédant ainsi, on peut reprendre les analyses au besoin, sans qu'il soit nécessaire de prélever de nouveaux échantillons. Le cas échéant, on prélèvera l'échantillon de l'épreuve de germination dans ce qui reste de la fraction de semences pures de l'échantillon de travail original, suivant les méthodes décrites dans les sections 3.4.1 et 3.4.2.

2.8 Échantillonnage au laboratoire

À la section 3.4.2, on traite en détail des méthodes qui s'emploient en laboratoire pour réduire l'échantillon d'analyse afin de préparer un échantillon de travail adéquat.

2.9 Identification et scellement du lot

2.9.1 Instructions générales

Lorsque l'échantillonnage est effectué par un employé du service de contrôle des semences, il faut que le marchand emploie des contenants qu'on peut sceller de façon que personne ne puisse les ouvrir sans autorisation.

Les contenants doivent aussi être étiquetés et identifiés et ceux qui font partie d'un même lot doivent recevoir la même formule d'identification. Au moment de l'échantillonnage, il faut étiqueter ou marquer tous les contenants du lot avec la formule indiquée dans le rapport. Cette formule doit être approuvée ou attribuée par le service chargé de contrôler le lot.

Immédiatement après l'échantillonnage, l'échantillonneur doit sceller les contenants ou les faire sceller en sa présence. Un contenant est considéré scellé s'il est apparemment impossible de l'ouvrir sans détruire le sceau ou laisser des traces indiquant qu'il a été ouvert. Sous la surveillance de l'échantillonneur, chaque contenant doit recevoir un sceau officiellement reconnu, une marque indélibile ou une étiquette indécollable. Il faut sceller le lot échantillonné, ou la partie qui a été échantillonnée.

Souvent au Canada, les marchands de semences forestières emballent les graines dans des sacs de plastique (c'est le contenant) qui sont placés dans des boîtes de carton pour le transport. C'est ce sac, c'est-à-dire le contenant, qu'il faut sceller; à cette fin, on a mis au point la méthode décrite ci-après.

2.9.2 Méthode d'identification et de scellement

Comme «marques d'identification officielles», on se sert de deux étiquettes de métal sur lesquelles sont inscrits le nom du service de contrôle des semences et le numéro officiel de l'échantillon. La marque d'identification officielle est notée sur le rapport qu'on dresse pour chaque lot. On place une étiquette à l'intérieur du contenant, au cas où l'autre, qu'on met à l'extérieur, se détacherait. On ferme le sac au moyen d'une attache de plastique à fermeture automatique sur laquelle on appose un sceau à fil de plomb. La suite complète des opérations se déroule comme suit :

i) Si le lot de semences a été certifié conformément au programme de l'OCDEF[1], placer l'étiquette de l'OCDE appropriée ainsi qu'une étiquette métallique (marque d'identification officielle) dans le contenant, sur les graines.

ii) Tordre l'encolure du sac pour bien le fermer. Si le sac se trouve dans une boîte pour le transport, en expulser l'air autant que possible. Si le sac n'est pas encore dans une boîte, on peut y laisser un peu d'air pour qu'il reste souple.

Fermer l'encolure du sac au moyen de l'attache de plastique en serrant bien.

iii) Cette attache est difficile à enlever, mais il est néanmoins possible de l'ouvrir. Pour parer à cette éventualité, percer un trou au moyen d'une aiguille, près du dispositif de fermeture.

iv) Introduire le fil du sceau de plomb dans le trou. Enfiler sur ce fil la deuxième étiquette de métal poinçonée ainsi que la deuxième étiquette de l'OCDE. (Les étiquettes de l'OCDE ne s'utilisent que lorsque le lot a été conformément au programme de l'OCDE. Dans certains cas, on peut mettre une autre étiquette avec la deuxième étiquette de métal poinçonnée; il s'agit souvent de la marque d'identification du marchand.)

v) Enfiler le fil dans les deux trous du sceau de plomb et, au moyen d'une paire de pinces à sertir, presser le sceau sur le fil : les initiales du service de contrôle des semences seront ainsi imprimées sur les deux faces du sceau. Le fil se dégage du sceau, quoique difficilement, mais comme le sceau reste déformé, il est impossible d'y replacer le fil; essentiellement donc, ce dispositif de scellement est sûr.

[1]Piesch, R.F.; Stevenson, R.L., 1976. Certification des semences d'arbres du Canada identifiées à la source conformément au système de l'OCDE. Serv. can. des forêts. Rapp. techn. de for. 19F, 18 p.

3. *Contrôle de la pureté*

3.1 But

On contrôle la pureté afin de savoir quelles proportions de graines et de corps étrangers, tels qu'aiguilles ou écailles de cônes, le contenant renferme. L'analyse permet de déterminer le poids de trois composants : les semences pures, qui proviennent de l'essence de production, les graines provenant d'autres essences et les particules inertes.

3.2 Définitions

Semences pures :
graines provenant de l'essence signalée dans la déclaration du demandeur ou qui se révèlent les plus abondantes à l'analyse, en considérant toutes les variétés botaniques et les cultivars de l'espèce en question. Les éléments énumérés ci-après (même s'ils sont immatures, trop petits, racornis, attaqués par une maladie ou s'ils ont germé, à condition qu'on puisse déterminer formellement qu'ils appartiennent à l'espèce considérée) font partie des semences pures, à moins qu'ils n'aient été transformés par des champignons (sclérotes, charbon) ou des nématodes (galles).

i) Graines intactes (c'est-à-dire graines au sens botanique du terme). Dans le cas des conifères, il s'agit la plupart du temps de graines dont les ailes et les téguments ont été enlevés (section 3.3); les graines de *Chamaecyparis*, de *Cupressus* et de *Thuja* font exception.

ii) Fragments de graines plus gros que la moitié de la graine entière. Les graines de conifère qui ont perdu tous leurs téguments sont toutefois classées comme des particules inertes.

Autres graines :
graines ou autres corps de même nature provenant d'autres espèces que celle dont sont issues les semences pures. Les caractères distinctifs par lesquels on définit les semences pures s'appliquent aussi aux graines de cette catégorie.

Particules inertes :
i) Fragments de graines qui représentent la moitié ou moins de la graine entière, et graines de conifères qui ont perdu leurs téguments. (Il faut apporter une attention particulière à l'examen des graines brisées, car si elles représentent la moitié ou moins de la graine entière, elles se placent dans la catégorie des particules inertes, alors que si elles représentent plus de la moitié de la graine entière, elles se classent dans la catégorie des semences pures).

ii) Terre, sable, pierres, balle, tiges, feuilles, aiguilles, écailles de cônes, ailes, fragments d'écorce, fleurs, bourgeons, larves d'insectes et tout autre chose qu'une graine.

3.3 Ailes et téguments

Les ailes des graines d'*Acer, Betula, Chamaecyparis, Cupressus* et *Thuja* sont considérées comme faisant partie de la graine et ne sont pas enlevées durant le traitement. Pour ces essences, la fraction des semences pures se compose donc de graines aux ailes intactes.

L'aile des graines d'*Abies*, de *Larix* et de *Pseudotsuga* est attachée au tégument; celui-ci s'enlève difficilement par les procédés de traitement normaux sans que la graine s'abîme, mais l'aile s'en détache facilement. Les ailes et les téguments de graines de *Pinus, Picea, Cedrus* et *Tsuga* sont par contre faciles à enlever; les échantillons de graines provenant de ces essences ne devraient donc contenir ni ailes ni téguments.

3.4 Méthode d'analyse

Pour l'évaluation de la pureté, il faut examiner au moins 2 500 graines; si les graines sont très petites, l'échantillon doit peser au moins 0,5 g et si elles sont très grosses, au plus 1 000 g. On donne au tableau 1 le poids de l'échantillon selon l'espèce.

L'évaluation de la pureté se fait sur un échantillon de travail qu'on tire de l'échantillon d'analyse.

3.4.1 Échantillon de travail

L'échantillon d'analyse est plus gros que l'échantillon de travail utilisé dans les analyses pour deux raisons : i) le laboratoire de contrôle doit en conserver une partie un an au cas où il faudrait reprendre les analyses (section 2.7.2); ii) on peut en tirer un deuxième échantillon si pour une raison quelconque il a fallu interrompre le premier contrôle ou en rejeter les résultats. En général, il faut donc le réduire pour préparer l'échantillon de travail.

3.4.2 Échantillonnage au laboratoire

Pour préparer l'échantillon de travail, il faut bien mélanger l'échantillon d'analyse et le diviser à plusieurs reprises en deux portions égales, suivant l'une ou l'autre des méthodes décrites ci-après.

a) Méthode du séparateur mécanique

Cette méthode est indiquée pour les graines fluantes. Le séparateur permet de diviser l'échantillon en deux portions à peu près égales (section 2.5.2[b]). On réduit l'échantillon en le divisant à plusieurs reprises jusqu'à ce qu'on

obtienne une portion dont le poids est proche de la valeur prescrite (tableau 1), mais n'est pas moindre.

On peut se servir à cette fin de divers types de séparateurs :

i) Le séparateur de terre décrit à la section 2.5.2(b).

ii) Le séparateur conique (ou séparateur de Boerner). Ce séparateur fonctionne de la même façon que le séparateur de terre, sauf que les goulottes sont disposées à la base d'un cône. Les graines sont retenues dans la trémie jusqu'à ce qu'on ouvre la vanne; elles tombent alors sur le cône, puis dans les goulottes de séparation. Comme le séparateur de terre, le séparateur conique permet de diviser une masse de graines en deux portions représentatives. On divise à nouveau l'une des deux portions et ainsi de suite, jusqu'à ce que l'échantillon ait atteint le poids voulu.

iii) Le séparateur centrifuge (ou séparateur Gamet). Dans ce séparateur, les graines s'écoulent de la trémie jusqu'à la centrifugeuse, une cuvette de caoutchouc peu profonde qui tourne sur un axe vertical mu par un moteur électrique. Sous l'action de la force centrifuge, les graines sont éjectées de la cuvette et tombent dans le compartiment séparateur que divise une cloison fixe qui permet de les diriger en proportions à peu près égales dans chacun des déversoirs. Les pattes de cette machine sont ajustables; pour que les résultats soient uniformes, il faut la mettre de niveau. On peut s'en servir pour mélanger des graines ou réduire un échantillon suivant les mêmes méthodes qu'avec le séparateur de terre (section 2.5.2[b]) et le séparateur conique (section 3.4.2[a][ii]).

b) Méthode des gobelets
Dans cette méthode, on dispose au hasard de petits gobelets, ou un autre genre de contenant, sur un plateau et on verse au-dessus l'échantillon d'analyse en répartissant les graines uniformément. On se sert généralement de huit gobelets au plus. La plupart des graines tombent dans le plateau, mais une certaine partie se retrouve dans les gobelets : elles constituent l'échantillon de travail et sont recueillies dans un contenant plus grand. Il faut répéter l'opération si l'on ne recueille pas suffisamment de graines en une seule fois. On peut choisir des gobelets plus grands ou plus petits, selon la grosseur des graines. La méthode des gobelets est indiquée pour la préparation des échantillons de travail de 10 g au plus.

c) Méthode de division modifiée
Dans cette méthode, on se sert d'une grille à compartiments cubiques de dimensions identiques; les compartiments sont tous ouverts dans le haut et un sur deux n'a pas de fond. Après avoir placé la grille sur un plateau ou sur une grande feuille de papier, on verse les graines au-dessus en les répartissant uniformément pour couvrir toute la grille. Lorsqu'on enlève celle-ci, une partie des graines est retenue dans les compartiments à fond, le reste se trouve dans le plateau. Si la quantité de graines recueillies ne suffit pas, on répète l'opération. S'il y a trop de graines, on fait une nouvelle réduction par la même méthode. Pour les graines de conifères, une grille à compartiments de 50 cm de côté donne de bons résultats. On peut facilement s'en fabriquer une en assemblant par demi-joints de minces languettes de contreplaqué ou de plastique de 50 mm de largeur. Pour le fond des compartiments, on peut utiliser des carrés de carton, ou d'un matériau du même genre, qu'on colle ou qu'on broche.

d) Méthode de la cuillère
Après avoir mélangé l'échantillon d'analyse, on le verse dans un plateau en répartissant les graines uniformément. Au moyen d'une cuillère et d'une spatule, on prélève de petites portions en au moins cinq points, choisis au hasard; on continue les prélèvements tant que l'échantillon n'a pas le poids voulu. Cette méthode ne sert que pour les petites graines.

Notons que dans les méthodes b, c, et d, il ne faut pas chercher à remplir chaque gobelet ou compartiment, mais plutôt verser les graines de façon uniforme en faisant un mouvement de balancier sur la longueur, puis sur la largeur.

3.4.3 Séparation pour l'évaluation de la pureté

Peser l'échantillon de travail au degré de précision indiqué à la section 3.4.4 et noter le poids. On fait cette pesée avant de séparer l'échantillon pour savoir s'il s'est perdu du matériel durant la séparation.

Séparer à la main les trois composants de l'échantillon de travail suivant la définition qu'on en donne à la section 3.2 : semences pures, autres graines et particules inertes. Examiner et identifier chaque élément en veillant à ce que cette opération n'amenuise pas la faculté germinative des semences pures. Apporter une attention particulière aux graines abîmées (section 3.2), aux ailes et aux téguments (section 3.3). Les

graines dont le tégument ne présente aucune lésion visible sont classées dans les semences pures (ou avec les autres graines), qu'elles soient vaines ou pleines. Il n'est pas nécessaire de retourner la graine pour voir s'il y a des lésions de l'autre côté. S'il y a des graines brisées, il faut décider si la portion solide qui reste représente plus de la moitié de la graine entière et appliquer la règle énoncée en 3.2.ii. Les graines décortiquées, c'est-à-dire, les graines de conifères dont les téguments sont complètement disparus, sont classées dans la catégorie des particules inertes (section 3.2).

3.4.4 Pesée, calculs et présentation des résultats

Après la séparation, on pèse chaque composant au degré de précision minimal nécessaire pour calculer la pourcentage au nombre de décimales indiqué ci-après :

Poids de l'échantillon de travail (g)	Nombre de décimales
Moins de 1	4
de 1 à 9,999	3
de 10 à 99,99	2
de 100 à 999,9	1
1 000 ou plus	0

La somme des pourcentages des composants doit donner 100. Les composants de moins de 0,05 % sont dits des «traces». Si l'un ou l'autre des composants est nul, on le signale comme tel. Il faut employer les noms scientifiques du tableau 1.

On détermine les pourcentages des composants avec la somme de leurs poids, et non pas en fonction du poids de l'échantillon de travail entier; il faut cependant comparer la somme des poids des composants avec le poids de l'échantillon entier pour voir s'il s'est perdu du matériel ou s'il y a eu une erreur quelconque (section 3.4.3). Si la somme des poids des composants est inférieure de 1 % ou plus au poids de l'échantillon entier, il faut prélever un nouvel échantillon de travail et refaire la séparation. Il n'est pas nécessaire de calculer le pourcentage d'un type de graines autre que celui des semences pures ou d'un type de particules inertes en particulier, à moins qu'il n'y en ait 1 % ou plus.

Si l'échantillon de travail contient des graines dont l'aile est entière (*Abies, Larix, Pseudotsuga*) ou qui portent une partie de leur tégument et de leur aile (*Pinus, Picea, Cedrus, Tsuga*), il faut les isoler des graines qui ne présentent pas de telles impuretés et les peser séparément. On fait ensuite la somme des deux poids obtenus pour déterminer le poids total des «semences pures». Il faut toutefois déterminer la proportion de graines portant des impuretés par rapport au poids total des semences pures et donner cette valeur séparément. Il n'est pas nécessaire de déterminer le poids des impuretés, telles que les ailes et les téguments encore attachés aux graines.

4. *Détermination du poids des graines*

4.1 But

Il s'agit de déterminer le poids de l'échantillon, tel qu'on le reçoit, par 1 000 graines; en général, on fait cette détermination en même temps que l'évaluation de la pureté. Ce renseignement sert au producteur pour calculer d'après le poids d'un contenant le nombre de graines qu'il renferme.

4.2 Méthode

On compte toutes les graines de la fraction de semences pures ou celles de doubles tirés de cette fraction. Connaissant le poids de la fraction de semences pures, on peut déterminer sans problème le poids d'une portion de 1 000 graines.

4.2.1 Comptage de doubles

La méthode des doubles est plus employée, car on utilise ensuite ceux-ci pour l'évaluation de la faculté germinative (section 5). On prélève au hasard 8 doubles de 100 graines chacun dans la fraction de semences pures. On pèse chacun au même degré de précision que pour la détermination de la pureté (section 3.4.4), puis on calcule le poids moyen.

4.2.2 Calculs et présentation des résultats

La variance, l'écart-type et le coefficient de variation (CV) se calculent comme suit :

$$\text{Variance} = \frac{n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}{n(n-1)}$$

où x = poids de chaque double en grammes,

n = nombre de doubles,

E = somme.

Écart-type : $s = \sqrt{\text{variance}}$

Coefficient de variation :

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

où $\bar{x}$ = poids moyen d'un double (100 graines).

Si le CV dépasse 4,0, il faut prélever 8 autres doubles, les peser, en dénombrer les graines et calculer la variance(s) pour les 16 doubles. Les doubles qui s'écartent de la moyenne ($\bar{x}$) d'une valeur supérieure au double de l'écart-type ainsi déterminé sont exclus.

Pour déterminer le poids moyen d'un millier de graines, on multiplie par dix le poids moyen de 100 graines, déterminé avec 8 doubles ou plus (c'est-à-dire $10 \times \bar{x}$) Le résultat doit être précis au même nombre de décimales près que celui de la détermination de la pureté (section 3.4.4).

5. *Évaluation de la faculté germinative*

5.1 But

L'évaluation de la faculté germinative est peut-être l'analyse la plus importante dans le contrôle des semences; elle sert à déterminer la valeur productive des semences et permet de comparer de ce point de vue différents lots. On peut faire l'épreuve de germination en conditions réelles, mais en général les résultats ne sont pas satisfaisants, car il est difficile de toujours reproduire les mêmes conditions. Lorsque l'épreuve se fait en laboratoire, on contrôle, selon la méthode employée, tous les facteurs, sinon une partie d'entre eux, du milieu qui influent sur la germination. On a mis au point des méthodes normalisées dans lesquelles on réunit les conditions où la germination de la plupart des semences d'une espèce donnée sera la plus uniforme, la plus rapide et la plus complète possible. Avec ces méthodes, on peut reproduire les résultats des épreuves entre des limites aussi près que possible de celles que détermine la variation de l'échantillonnage aléatoire.

Dans les pages suivantes, on décrit les méthodes prescrites pour l'évaluation de la faculté germinative en laboratoire; il faut les suivre dans toutes les analyses effectuées pour des fins officielles (c'est-à-dire qui sont d'intérêt public). Pour l'évaluation des semences qui ne donnent pas des résultats satisfaisants avec les méthodes habituelles, on peut essayer d'autres techniques ou utiliser des méthodes modifiées afin de recueillir autant de renseignements que possible sur la viabilité et la faculté germinative. Lorsque la méthode employée ne fait pas partie des méthodes prescrites, il faut le signaler dans le rapport.

5.2 Définitions

Germination :
développement de l'embryon de la graine et formation des éléments essentiels qui, selon le type de semences évaluées, dénotent que la graine peut donner une plante normale en conditions de culture réelles. En laboratoire, les épreuves de germination nous renseignent sur le potentiel de production des graines de l'échantillon évalué.

Taux de germination :
proportion, sur 100 graines, de l'échantillon de semences original qui a donné des plantes considérées normales, dans le délai prescrit (selon 5.7.5).

Plantules normales :
plantules possédant les éléments essentiels qui dénotent que la graine peut produire une plante normale en conditions de culture réelles.

Plantules anormales :
plantules présentant une ou plusieurs anomalies et qui ne peuvent être considérées normales. Dans les épreuves sur substrat artificiel, les plantules qui présentent les anomalies suivantes sont considérées anormales :

i) Plantules endommagées : plantules sans cotylédons ou dont les éléments essentiels présentent des constrictions, des crevasses, des fissures ou des lésions qui ne sont ni superficielles ni limitées à une zone en particulier; plantules sans racine primaire (chez les espèces où la racine primaire est un élément essentiel).

ii) Plantules déformées : plantules chez lesquelles le développement des éléments essentiels est insuffisant ou déséquilibré, par exemple lorsque la gemmule, l'hypocotyle ou l'épicotyle sont tordus ou rabougris; plantules à pousses gonflées et à racines rabougries; plantules de consistance spongieuse et d'aspect vitreux ou dont le développement s'est interrompu après la germination.

iii) Plantules pourries : plantules dont l'un ou l'autre des éléments essentiels est pourri ou attaqué par la maladie au point que son développement ne peut se poursuivre normalement, *sauf* lorsqu'il est nettement évident que l'infection n'a pas commencé dans la graine elle-même.

Semences fraîches :
graines qui ont absorbé de l'eau et qui paraissent fermes et aptes à germer, mais dont la germination n'a pas encore commencé à la fin de la période prescrite alors qu'elles ont été placées dans les conditions prescrites.

Graines en dormance :
graines qui, en raison de leur état physiologique, des propriétés de leur tégument ou du stade du développement embryonnaire, ne germeront pas dans les conditions prescrites, à moins qu'on ne leur fasse subir un traitement pour interrompre la dormance. Cette définition s'applique aussi aux graines qui, comme celles des légumineuses et des malvacées, restent dures parce qu'elles ne peuvent absorber de l'eau à cause de l'imperméabilité de leur tégument.

Graines mortes :
graines qui ne sont ni dures ni fraîches et qui n'ont pas donné de plantule à la fin de la période prescrite.

Graines vaines :
graines vides ou renfermant des vestiges de tissus ne comportant ni endosperme ni embryon.

Graines attaquées par des insectes :
graines qui renferment des larves ou des chiures d'insectes ou qui présentent d'autres signes dénotant qu'elles ont été attaquées par des insectes et que leur faculté germinative s'en est trouvée affectée.

Température :
température à l'endroit où les graines sont placées pour l'épreuve de germination. On donne au tableau 2 la température de germination recommandée selon le type de semences évalué (voir également la section 5.7.1).

Refroidissement préalable :
pour interrompre la dormance des graines présumées dormantes, on dépose celles-ci à la surface ou à l'intérieur d'un substrat humide et on les garde un certain temps à une température constante, entre 1 et 5°C. On peut aussi les faire tremper 24 heures dans l'eau à la température de la pièce (18-22°C), puis, après les avoir égoutées, les placer dans un récipient de verre ou de plastique ou dans un sac de polyéthylène pour ensuite les laisser au froid (entre 1 et 5°C) pendant un certain temps.

Au tableau 2 on fait diverses recommandations sur le refroidissement préalable (voir également la section 5.7.4).

5.3 Principes généraux

Il faut employer des semences pures pour l'épreuve de germination; lorsque les graines peuvent être séparées, on prélève l'échantillon dans la fraction de semences pures préparée pour l'évaluation de la pureté suivant les indications de la section 3. On ne fait aucun traitement préalable, à l'exception de ceux qu'on recommande au tableau 2, à moins d'indication contraire dans la demande. Si l'on fait d'autres analyses après un traitement préalable autre que ceux recommandés, il faut noter les résultats dans le rapport et expliquer le traitement effectué. Après avoir constitué des doubles, on dépose les graines à la surface ou à l'intérieur d'un substrat qu'on garde dans les conditions d'humidité, de température et d'éclairage prescrites au tableau 2. Au terme de la période prescrite au tableau 2, on examine chaque double et on compte les graines et les plantules en les classant dans les diverses catégories décrites dans la section 5.8. Le premier comptage et les comptages intermédiaires peuvent se faire plus tôt, pourvu qu'on respecte les conditions énoncées dans la section 5.7.5.

5.4 Matériel

On peut employer divers types de substrat, notamment du papier, du sable ou de la terre.

5.4.1 Papier

Tous les papiers filtre ou les papiers buvard qui remplissent les conditions décrites ci-après devraient convenir à la plupart des semences forestières. Il faut un papier poreux, sans revêtement, qui ne présente aucun défaut et ne comporte aucune impureté. Il ne doit avoir subi aucun traitement contre les moisissures ou les bactéries durant la fabrication et doit être exempt de tels organismes. Il ne doit contenir aucune matière toxique pour les graines en germination. Il doit se composer à 100 % de fibres de bois blanchies, de fibres de coton ou d'une autre fibre cellulosique végétale; il doit être blanc, sinon il doit avoir été coloré avec un colorant non toxique. Sa texture doit être telle que les racines de la plantule n'y pénètrent pas en se développant; il peut être crêpé. Lorsqu'il est imbibé d'eau, il doit avoir au moins 2 mm d'épaisseur.

Pour déterminer si un papier est toxique, on y fait germer des graines de graminées comme la fléole des prés (*Phenum pratense*), l'agrostis blanc (*Agrostis gigantea*) ou la fétuque (*Festuca rubra* var. *commutata*) et on compare les plantules avec celles produites sur un papier connu et acceptable pour évaluer le développement des racines. Cette évaluation doit se faire au bout de cinq jours lorsqu'on emploie des graines de fléole des prés ou d'agrostis blanc, et au bout de sept jours lorsqu'on emploie de la fétuque, car c'est durant les permiers stades de la croissance des racines qu'il est le plus facile de déceler les signes d'une inhibition légère. La pointe des racines dont la croissance est inhibée parce que le papier est toxique est plus courte et elle est parfois décolorée, les racines s'élèvent au-dessus du papier, leurs poils forment des touffes et la gemmule est parfois plus petite que la normale.

Les substrats de papier présentent un grand inconvénient, car les moisissures ont tendance à s'y propager rapidement. On peut y pallier en espaçant bien les graines, mais lorsque l'infection est grave, il peut devenir nécessaire d'enlever les graines attaquées ou mortes au cours de l'épreuve; il peut aussi être nécessaire de changer le papier.

Tableau 2. Conditions[a] prescrites pour l'évaluation de la faculté germinative des semences forestières

Espèce	*Substrat*	*Température (C)*	*Premier comptage (jours)*	*Dernier comptage (jours)*	*Instructions supplémentaires concernant notamment l'interruption de la dormance*
Abies amabilis *Abies grandis*	TP	20–30	7	28	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours.
Abies balsamea *Abies lasiocarpa*	TP	20–30	7	28	Refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C.
Acer rubrum	S(TP)	20–30	7	21	Refroidissement préalable de 42 à 56 jours à 1 à 5° C.
Acer saccharinum	S(TP)	20–30	7	14	
Acer saccharum	S(TP)	20	7	21	Refroidissement préalable de 2 mois à 1 à 5° C. Il est bon d'enlever le péricarpe des graines avant l'épreuve. Les graines fraîches non séchées sont généralement dans un état de dormance plus profonde que les graines séchées ou conservées après séchage ou non.
Aesculus hippocastanum	S	20–30 (20)	7	21	Faire tremper les graines 48 heures; en retrancher le tiers à l'extrémité du hile. Laisser le tégument sur la partie employée dans l'épreuve. Il peut être nécessaire de refroidir au préalable les capsules fraîches.
Alnus spp.	TP	20–30	7	21	
Betula alleghaniensis	TP	20–30	7	21	Refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C.
Betula papyrifera	TP	20–30	7	21	8 à 16 heures d'éclairage.
Chamaecyparis nootkatensis	TP	20 (20–30)	7	28	1) Faire tremper les graines comme s'il s'agissait d'un refroidissement préalable, mais les garder ainsi 30 jours à 20 à 25° C (température ambiante), puis refroidir 120 jours à 1 à 5° C. 2) Faire une TZ.
Fraxinus spp.	— (TP)	— (20–30)	— (14)	— (56)	(1) Faire une TZ. (2) (Traitement préalable : 2 mois à 20° C, puis 7 mois 1 à 5° C).
Larix laricina	TP	20–30	7	21	
Larix occidentalis	TP	20–30	7	21	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C. Épreuves doubles.
Picea abies *Picea mariana* *Picea rubens*	TP	20–30	7	21	
Picea engelmannii *Picea glauca* *Picea sitchensis*	TP	20–30	7	21	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C. Épreuves en double. Dans certains cas, un éclairage de plus de 8 heures peut être bénéfique.
Pinus albicaulis	TP	20–30	7	28	Refroidissement préalable de 28 jours à 1 à 5° C.
Pinus banksiana	TP	20–30	7	14	
Pinus contorta	TP	20–30	7	21	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C.
Pinus flexilis	TP	20–30	7	21	Refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C.

Tableau 2 (suite et fin)

Espèce	*Substrat*	*Température (C)*	*Premier comptage (jours)*	*Dernier comptage (jours)*	*Instructions supplémentaires concernant notamment l'interruption de la dormance*
Pinus monticola	TP	20–30	7	21	1) Faire tremper les graines comme s'il s'agissait d'un refroidissement préalable, mais les garder 30 jours à 20 à 25° C (température ambiante), puis refroidir 60 jours à 1 à 5° C. 2) Faire une TZ.
Pinus nigra	TP	20–30	7	21 (14)	
Pinus ponderosa	TP	20–30	7	21	Pas de refroidissement préalable et refroidissement préalable de 35 jours à 1 à 5° C. Épreuves doubles.
Pinus strobus	TP	20–30	7	28	1) Refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C. Dans certains cas, un éclairage de plus de 8 heures peut être bénéfique. 2) (Faire une TZ).
Pinus sylvestris	TP	20–30 (20)	7	21 (14)	
Populus spp.	TP	20–30	3	10	
Pseudotsuga menziesii	TP	20–30	7	21	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C. Épreuves doubles.
Quercus spp.	S	20	7	28	Faire tremper les graines 48 heures au plus, puis en retrancher le tiers à l'extrémité du hile et enlever le tégument.
Salix spp.	TP	20–30	7	14	
Sequoiadendron giganteum	TP	20–30	7	28	
Taxus spp.	— (S)	— (20–30)	— (7)	— (28)	1) Faire une TZ. 2) (Refroidissement préalable de 9 mois à 1 à 5° C).
Thuja spp.	TP	20–30	7	21	
Tsuga canadensis	TP	15	7	28	Refroidissement préalable de 28 jours à 1 à 5° C.
Tsuga heterophylla *Tsuga mertensiana*	TP	20	7	35	Aucun refroidissement préalable et refroidissement préalable de 21 jours à 1 à 5° C. Épreuves doubles.

**Les méthodes et conditions les moins recommandées sont indiquées entre parenthèses.*

Signification des symboles :

TP – épreuve de germination sur feuille de papier
S – épreuve de germination dans du sable
TS – épreuve de germination sur du sable
TZ – épreuve au tétrazolium

5.4.2 Sable

Si l'on emploie du sable, il faut le stériliser, à moins qu'on ne soit certain qu'il ne contient aucune substance toxique, aucun organisme pathogène ni aucune autre graine. Il faut choisir un sable qui ne contient ni petites (moins de 0,05 mm) ni grosses (plus de 0,8 mm) particules et qui soit neutre ou légèrement acide (pH = 6,0-7,0). On l'arrose pour le saturer à 50 à 60 %, la quantité d'eau exacte dépendant du type de sable et de la nature des graines qu'on veut faire germer; ainsi, les très grosses graines absorbent plus d'eau, si bien qu'il faut humidifier le sable davantage. Il peut être nécessaire de réhumidifier le sable s'il s'assèche et à cette fin, on recommande d'employer un vaporisateur produisant de fines gouttelettes; il faut toutefois éviter l'humidification excessive (section 5.7.3). Si l'on pense qu'il sera nécessaire de faire des réhumidifications fréquentes, on peut peser le contenant de sable humidifié avant de commencer l'épreuve, une fois qu'on y a déposé les graines; ainsi, lorsqu'il faudra réhumidifier le sable, il suffira d'ajouter l'eau nécessaire pour que le contenant reprenne son poids initial. Pour évaluer la faculté germinative des grosses graines comme celles de *Quercus*, d'*Aesculus* et de *Castanea* ou des graines dont la germination est longue comme celles de *Carpinus*, de *Fraxinus* et de *Rosa*, on utilise normalement du sable, car la croissance microbienne y est ralentie et l'humidité et l'aération y sont propices.

L'un des principaux inconvénients du sable vient de ce que les racines des plantules s'enchevêtrent, de sorte que si l'on veut les examiner au début de la germination, on risque de déplacer les autres graines qui commencent à germer, ce qui peut les abîmer. On peut réutiliser le sable, mais il faut le stériliser avant de s'en servir. Si l'on décèle des signes de phytotoxicité, il faut le rejeter.

5.4.3 Terre

Comme la terre est une matière plus difficile à normaliser et que, par conséquent, les résultats peuvent présenter une certaine variation, il n'est généralement pas recommandé d'employer ce substrat pour l'évaluation de la faculté germinative. La terre est un tampon naturel et, en raison de ses propriétés collodales, de nombreuses toxines y sont inactivées. C'est donc le substrat indiqué pour vérifier des résultats douteux; il faut l'utiliser pour refaire l'analyse des échantillons officiels présentant des signes de phytotoxiticé dans d'autres substrats (section 5.8). Il faut employer une terre de bonne qualité, par exemple du limon de jardin. Si elle a tendance à se tasser, il faut y ajouter du sable; on l'humidifie jusqu'à ce qu'on puisse façonner une boule qui se désagrège facilement lorsqu'on la presse entre deux doigts. Après l'avoir humidifiée, on la passe au tamis pour enlever les particules de plus de 1 mm; on peut ensuite l'employer, mais sans la tasser.

Selon certaines règles de l'évaluation de la faculté germinative, si l'on emploie de la terre comme substrat, il peut être nécessaire de la stériliser pour détruire les organismes pathogènes ou les graines d'origine inconnue qu'elle peut contenir; cependant, la microflore naturelle de certains sols peut inhiber la croissance des champignons qui détruisent les graines mises à germer sur du papier. La stérilisation à la vapeur peut déterminer la formation de composés phytotoxiques impossibles à éliminer autrement qu'en réinfectant la terre avec des microorganismes et en les y laissant se développer. Lorsqu'on emploie de la terre, il ne faut donc la stériliser que si elle contient une qualité telle d'organismes pathogènes ou de graines d'origine inconnue que les résultats de l'épreuve risquent de s'en trouver affectés.

5.4.4 Autres substrats

Toute substance employée comme substrat pour la germination des semences forestières doit remplir certaines conditions essentielles : (i) elle ne doit pas être toxique pour les graines en germination; (ii) elle ne doit renfermer ni moisissures ni d'autres microorganismes; (iii) elle doit être suffisamment humidifiée et aérée; enfin (iv), il doit être possible d'en faire un usage normalisé de façon que les résultats soient reproductibles. Si l'on emploie autre chose que du papier, du sable ou de la terre, suivant les indications données précédemment, il faut le mentionner dans le rapport (section 5.10).

Le «Kimpak» est très employé; c'est une sorte de tampon léger et crêpé, constitué de plusieurs couches de cellulose, qui retient suffisamment d'eau, même pour les grosses graines, comme celles de *Quercus*, qu'on recommande habituellement de faire germer dans le sable. D'autres produits s'emploient également souvent, notamment la pierre ponce broyée, la perlite et la vermiculite (mica transformé). On peut aussi faire des mélanges; par exemple, on peut faire germer les graines sur un papier ordinaire placé sur un morceau de Kimpak, de sorte qu'elles ont un apport d'eau uniforme sans qu'il soit nécessaire d'installer une mèche.

5.4.5 Eau

Pour l'épreuve de germination et le refroidissement préalable, il faut une eau sans impuretés dont le pH se situe autour du point de neutralité. À moins que l'eau du robinet ne soit très dure, c'est-à-dire qu'elle contienne beaucoup de sels minéraux, tels que calcium et magnésium, il n'y a aucune raison d'employer de l'eau distillée, celle-ci pouvant exiger une aération parce qu'elle est trop pauvre en O. L'eau désionisée peut donner des résultats plus uniformes que l'eau du robinet et ne nécessite aucun traitement d'aération spécial. Pour obtenir des résultats comparables, il faut toujours employer le même type d'eau.

5.5 Appareils

Il existe une grande variété de germoirs, conçus pour reproduire, par un moyen ou un autre, les conditions essentielles à la germination (chaleur, lumière, humidité et oxygène).

5.5.1 Germoirs ouverts

Le germoir en cloche, appelé aussi «appareil de Jacobsen» ou «réservoir de Copenhague», comporte une mèche, habituellement faite de papier filtre, qui sert à humidifier la surface de la graine. L'eau provient d'un réservoir sous-jacent ou d'un montage de conduites spéciales. La température de germination est déterminée en grande partie par celle de l'eau; la température à la surface des graines se contrôle mieux lorsque l'appareil est installé dans une pièce où l'air est climatisé. On dépose les graines sur de larges bandes de verre, d'acier inoxydable ou d'un autre matériau de nature appropriée; la face supérieure de ces bandes est garnie de papier filtre ou d'un autre type de substrat; les bandes sont suspendues au-dessus de l'eau. Pour que les graines aient toute l'humidité qui leur est nécessaire, on couvre le tout d'une cloche ou d'un entonnoir renversé; ce couvercle, en verre ou en plastique, doit être bien ajusté. Un petit orifice, au sommet, assure l'aération sans que l'évaporation soit excessive. Pour l'éclairage (lorsqu'il en faut), on se sert généralement de lampes qu'on suspend au-dessus des graines.

Ce montage prend beaucoup de place si l'on considère le nombre d'échantillons qu'il permet d'analyser. Dans certains modèles, il n'y a qu'un seul réservoir d'eau et, dans les épreuves où on prescrit un régime de températures en alternance, il faut le vider entièrement pour que le changement de température se fasse rapidement. Les modèles modernes comportent un circuit de conduites où la température de l'eau est constamment contrôlée, de sorte qu'on peut la changer rapidement.

5.5.2 Cabinets de germination

Le cabinet de germination est un appareil dans lequel la température, l'humitidé et, dans une moindre mesure, l'éclairage sont automatiquement contrôlés; on place les graines dans des plateaux découverts ou dans des boîtes peu profondes contenant le milieu de germination. On emploie souvent des boîtes fermées, parce que ainsi il n'est plus aussi important que l'humidité soit rigoureusement contrôlée dans le cabinet. On place les plateaux, ou les boîtes, sur des étagères perforées couvrant toute la section du cabinet et espacées de façon qu'on puisse y mettre le plus grand nombre d'échantillons possible. Les boîtes sont généralement faites d'un plastique rigide et transparent; certains modèles sont faits d'un matériau opaque. La lumière vient de lampes installées sur les côtés ou à l'arrière.

Le principal avantage du cabinet de germination est qu'on peut faire germer beaucoup plus d'échantillons à la fois, que l'opération demande moins de travail et que l'appareil prend moins d'espace que des germoirs de Jacobsen. L'éclairage n'est cependant pas uniforme, mais on peut pallier cet inconvénient en changeant la disposition des plateaux, ou des boîtes, ou en les tournant de 90° chaque fois qu'on examine les graines.

5.5.3 Chambres de germination

La chambre de germination est essentiellement un cabinet assez spacieux pour qu'on puisse y entrer pour placer les contenants de germination de chaque côté du passage qui y est aménagé. Dans ce genre d'installation, il faut veiller particulièrement au brassage de l'air pour que la température soit uniforme et que le taux d'humidité relative demeure élevé. Il est souvent difficile d'obtenir un éclairage uniforme, car, pour employer la chambre à pleine capacité, on superpose les étagères afin de faire plusieurs épreuves à la fois. Il faut espacer suffisamment les étagères pour pouvoir installer une lampe sous chacune d'elles. Toutes les graines peuvent germer en chambre de germination, mais ce genre d'installation convient surtout pour les grosses graines comme celles d'*Aesculus*. Pour limiter la déshydratation, on emploie toujours des contenants fermés. Avec des contenants de grande capacité, on peut non seulement mieux utiliser l'espace disponible, mais on est aussi mieux assuré que les graines se trouvent toutes dans les mêmes conditions. Comme les

graines d'un même double sont généralement réparties dans plusieurs contenants lorsqu'elles sont grosses, il faut bien identifier les contenants pour savoir de quel double ils font partie. En procédant ainsi, après la germination on ne sera pas tenté de regrouper les contenants de façon que les résultats se trouvent entre les limites acceptables (section 5.9).

On peut aussi placer des germoirs de Jacobsen ou des cabinets dans une chambre de germination. Dans ces conditions, la température se contrôle mieux, surtout en régime d'alternance, lorsque la température dans la chambre doit rester à la valeur minimale demandée.

5.6 Méthode

Bien mélanger les semences pures (section 3.2) et compter 400 graines, choisies au hasard, puis former des doubles de 100, 50 ou 25 graines. Pour former les doubles, on divise à plusieurs reprises les semences pures, suivant une méthode d'échantillonnage en laboratoire approuvée (section 3.4.2), jusqu'à ce qu'on obtienne à peu près le nombre de graines voulu, mais pas moins. On compte ensuite les graines, en les choisissant au hasard, et le reste est mis de côté. Il faut toujours compter les graines à la main, et non avec un tableau de comptage ou une pompe aspirante, car avec ces instruments, le comptage risque de se faire en faveur ou au détriment de certaines graines à cause de leur grosseur. On peut toutefois s'en servir, après le comptage, pour déposer les graines sur le substrat. Après le comptage, on dépose les graines sur le substrat humidifié en les espaçant uniformément et suffisamment, autant que possible, pour éviter que les plantules ne se touchent avant qu'on les ait dénombrées et enlevées.

Si l'on fait l'épreuve sur du papier, on dépose les graines sur des feuilles de papier qu'on a préalablement étalées dans des plateaux ouverts ou dans des boîtes ou des bois transparents fermés, puis on dépose le tout dans un cabinet ou une chambre de germination ou encore, si l'on se sert de germoirs de Jacobsen, on couvre chaque contenant d'une cloche ou d'un entonnoir renversé. Généralement, lorsqu'on emploie du sable comme substrat, on sème les graines dans une couche de sable humidifié uniforme, puis on les recouvre d'une épaisseur de 10 à 20 mm sans tasser; cette méthode est recommandée pour un grand nombre d'essences feuillues ainsi que pour certains conifères (tableau 2). Avec les autres espèces, on presse les graines à la surface du sable, sans les enfoncer.

On peut aussi employer de la terre ou un mélange de culture artificiel et semer les graines en profondeur ou en surface comme avec le sable; il peut cependant être plus difficile de normaliser le procédé. Si l'on décèle des signes de phytotoxicité chez des plantules qui ont poussé sur du papier ou du sable ou si les résultats sont douteux pour une quelque autre raison, on peut reprendre l'épreuve dans de la terre ou dans un substrat artificiel (sections 5.9 et 5.10).

5.7 Conditions de germination

Au tableau 2, on donne les conditions (substrats, température, éclairage et traitements spéciaux) de l'épreuve de germination prescrites selon l'espèce. Entre parenthèses on indique dans quelles autres conditions la germination peut se faire pour adapter l'épreuve en fonction des installations dont on dispose ou lorsqu'il faut évaluer des graines dont l'origine ou l'état sont particuliers. Les méthodes indiquées entre parenthèses sont les moins recommandées.

5.7.1 Température

La température de germination, prescrite au tableau 2, se mesure sur le substrat, à la hauteur des graines; elle doit être aussi uniforme que possible dans le germoir. Les valeurs indiquées sont des maximums; la température ne doit pas varier de plus de 1°C en 24 heures. Pour les épreuves en régime de température constante, on ne donne qu'une valeur. S'il y a deux chiffres, séparés par un tiret, l'épreuve doit se faire en régime d'alternance : les graines doivent être à la température inférieure 16 heures par jour, et à la température supérieure 8 heures. Si elles sont en dormance, il est essentiel que le changement de température à leur surface se fasse en une heure au plus. Enfin, durant les fins de semaine ou les congés, si personne ne peut veiller à l'alternance des températures, il faut laisser les graines à la température minimale.

5.7.2 Éclairage

Les graines de toutes les espèces mentionnées au tableau 2 doivent être éclairées suivant les indications données ci-après. Pour les graines dont la germination nécessite de la lumière, il faut un éclairage de 750 à 1 250 lux. Le développement des éléments essentiels s'évalue plus précisément lorsque la germination se fait sous un éclairage de faible intensité (jusqu'à 250 lux). Si l'on place dans le même germoir des graines qui demandent de la lumière et

des graines non photosensibles, il faut un éclairage de 750 à 1 250 lux. Comme la lumière n'inhibe pas la germination chez les espèces du tableau 2, il est plus simple d'utiliser un éclairage d'intensité standard (750-1 250 lux) pour toutes les épreuves.

On peut employer des fluorescents à lumière blanche froide, car ils émettent peu de rayons infrarouges (qui inhibent la germination) et beaucoup de rayons rouges (qui stimulent la germination). Il faut éclairer les graines au moins 8 heures par période de 24 heures; pour certaines espèces, il peut être bon de prolonger la période d'éclairage à 16 heures, comme on l'indique dans les instructions supplémentaires du tableau 2. L'éclairage continu est déconseillé, à moins qu'il ne soit démontré que la germination n'est pas inhibée dans ces conditions. Les graines soumises à un régime de températures alternantes doivent être éclairées durant la période où la température est élevée.

L'éclairage doit être aussi uniforme que possible au-dessus du substrat, et la chaleur des lampes ne doit pas faire monter la température de germination. Il faut placer les graines à la surface du substrat, sinon l'intensité de la lumière qu'elles reçoivent risque d'être inégale à cause de l'effet de filtration.

5.7.3 Humidité et aération

Le substrat doit toujours contenir suffisamment d'eau pour la germination, mais il ne faut pas trop l'humidifier, sinon l'aération peut s'en trouver ralentie. Sauf lorsqu'on recommande un taux d'humidité élevé, le substrat ne doit jamais être humide au point qu'il se forme une pellicule d'eau autour des graines.

La quantité d'eau employée pour humidifier le substrat au début de l'épreuve dépend de la substance et du volume utilisés. Par la suite, c'est le contrôleur qui décide s'il y a lieu de la réhumidifier, mais il faut éviter de le faire autant que possible, car on introduit un élément de variation supplémentaire qui peut influer sur les résultats. On peut limiter la déshydratation en constituant autour des graines une atmosphère saturée ou presque, ce qui réduit les pertes d'eau par évaporation. Pour augmenter le taux d'humidité de l'air, on peut se servir d'un humidificateur automatique, laisser un contenant d'eau découvert dans la chambre ou le cabinet de germination, placer les papiers de germination dans des bois ou couvrir les semis en terre ou en sable de feuilles de papier buvard imbibées d'eau ou encore de plaques de verre ou de plastique, jusqu'à ce que les plantules lèvent. Rappelons cependant que la condensation excessive n'est pas bonne pour les plantules.

5.7.4 Traitements spéciaux pour interrompre la dormance

Pour l'évaluation de la faculté germinative, on peut répartir les semences forestières en trois groupes :

i) Graines qui sont rarement dormantes et qui ne nécessitent donc pas de traitement spécial.

ii) Graines qui sont toujours dormantes et a) qui peuvent germer dans un délai de deux mois si on les a refroidies au préalable ou b) qui ne peuvent germer en deux mois parce qu'elles sont en dormance profonde. On préfère évaluer la viabilité de ce genre de graines par des épreuves rapides.

iii) Graines dont la dormance, plus ou moins profonde, est impossible à vraiment prévoir. Il faut les évaluer avec et sans traitement préalable (section 5.2).

Lorsque des graines sont soumises à un refroidissement préalable, on ne compte pas ce traitement dans la période de germination (section 5.7.5), mais il faut en indiquer la durée dans le rapport. Si l'on veut évaluer des graines avec et sans traitement, il faut faire les épreuves en même temps.

Pour les graines de certaines essences qui sont en dormance profonde, on recommande des épreuves de coloration biochimiques (tétrazolium) (section 7) ou des épreuves sur embryons excisés. Les méthodes à suivre dans les épreuves sur embryons excisés sont décrites dans le chapitre 6 (et dans l'annexe qui s'y rapporte) ainsi que dans l'appendice C des Règles internationales pour les essais de semences de 1985[1].

5.7.5 Durée de l'épreuve

La durée de l'épreuve de germination est indiquée au tableau 2; le refroidissement préalable n'est pas compté. Si à la fin de la période prescrite certaines des graines commencent juste à germer, on peut prolonger l'épreuve de sept jours supplémentaires. On peut aussi mettre fin à une épreuve avant le délai prescrit si aucune graine n'a germé au bout de sept jours. Le délai recommandé jusqu'au premier comptage est approximatif; il doit cependant

[1]Association internationale d'essais de semences. 1985. Règles internationales pour les essais de semences 1985. *Seed Science and Technology* 13 : 299-513.

permettre d'évaluer correctement les plantules, sinon il faut sauter cette étape. On peut faire des comptages intermédiaires pour enlever les plantules suffisamment développées, mais il vaut mieux se limiter au minimum pour éviter d'abîmer les plantules encore en développement. Par contre, si les plantules sont infectées par des champignons ou des bactéries, il peut être nécessaire de les compter et de les enlever plus fréquemment qu'il n'est prescrit. À tous les comptages, il faut dénombrer et enlever les graines manifestement mortes ou pourries qui pourraient contaminer les plantules en bonne santé.

5.8 Évaluation des plantules

Il faut évaluer chacune des plantules suivant les critères de normalité prescrits (section 5.2). Le développement des éléments essentiels doit être suffisamment avancé pour qu'on puisse déceler les anomalies. À la fin d'une épreuve, si la gemmule n'est pas encore apparue, il peut être nécessaire d'enlever le tégument de la graine et de séparer les cotylédons. L'évaluation des plantules produites sur un substrat artificiel ne pose généralement pas de difficulté, mais s'il est impossible de la faire, il faut reprendre l'épreuve dans du sable stérile ou de la terre de bonne qualité, à la température prescrite et dans des conditions d'éclairage et d'humidité propices (section 5.4.3). Pour avoir un point de comparaison à l'évaluation, on fait germer en même temps un autre échantillon de graines dont la faculté germinative est avérée normale. Lorsque des graines chimiquement traitées mises à germer sur un substrat artificiel donnent les plantules anormales présentant des signes de phytotoxicité, il faut vérifier les résultats de l'évaluation en reprenant l'épreuve dans de la terre de bonne qualité ou dans un mélange de culture artificiel (sections 5.4.3 et 5.6). Par ailleurs, si une graine est polyembryonnaire et donne plusieurs plantules, on n'en compte qu'une.

À la fin d'une épreuve de germination normale, il faut déterminer la proportion de graines fraîches; pour ce faire, on coupe longitudinalement les graines qui n'ont pas germé et on en examine l'intérieur. Les graines qui sont demeurées fermes et qui paraissent viables sont comptées dans la catégorie des graines fraîches qui n'ont pas germé. Pour évaluer la viabilité de ces graines, on peut faire une épreuve au tétrazolium (section 7).

Dans le cas des semences forestières, l'évaluation des graines vaines ou attaquées par des insectes (section 5.2) ne se fait que si l'on en a fait la demande avant l'épreuve de germination. Cette évaluation peut se faire avant ou après l'épreuve. Si on la fait avant la germination, on peut soit (i) radiographier les graines qui serviront à l'épreuve de germination ou (ii) disséquer les graines de quatre doubles supplémentaires de 100 unités prélevées dans la fraction de semences pures (lorsqu'il est impossible de faire des radiographies). Pour la dissection, on laisse tremper les graines dans l'eau de 24 à 48 heures à la température de la pièce; on les sectionne ensuite longitudinalement, puis on en examine l'intérieur pour déterminer à quelle catégorie elles appartiennent. Si l'évaluation se fait après l'épreuve de germination, on sectionne longitudinalement les graines qui n'ont pas germé, puis on en examine l'intérieur pour les classer. Quelle que soit la méthode employée, l'évaluation des graines vaines ou attaquées par des insectes est plus exacte lorsqu'on la fait avant la germination.

5.9 Calculs et présentation des résultats de l'épreuve de germination

On calcule le taux de germination moyen des quatre doubles de 100, 50 ou 25 graines employés dans l'épreuve, en arrondissant au nombre entier le plus proche. Pour les doubles de 100 graines, la différence entre le taux le plus élevé et le taux le plus bas ne doit pas dépasser la valeur maximale acceptable prescrite au tableau 3.

Lorsque les graines sont grosses et qu'il y en a moins de 100 par contenant (voir les sections 5.5.3 et 5.6), il faut identifier les contenants dans lesquels sont réparties les 100 graines de chaque double avant l'épreuve, sinon, il faut reconstituer les doubles en prenant des contenants placés côte à côte; il faut résister à la tentation de former des doubles de façon que les résultats se trouvent entre les limites acceptables (tableau 3). Si les résultats ne sont pas acceptables, il peut être impossible de reprendre l'épreuve, car dans certains cas, par exemple s'il s'agit de graines de *Quercus*, d'*Aesculus* ou de *Castanea*, il se peut que le reste de l'échantillon d'analyse soit insuffisant (il ne faut que 500 graines; voir le tableau 1) ou que les graines se soient détériorées durant la conservation (section 2.7). Le cas échéant, il faut un nouvel échantillon.

5.9.1 Reprise d'une épreuve

Les résultats ne sont pas satisfaisants (et ne figurent donc pas au rapport) et on doit reprendre

Tableau 3. Différences maximales acceptables entre les doubles

Si le taux de germination moyen vaut ou	*La différence[a] maximale acceptable entre les doubles vaut*
99	2	5
98	3	6
97	4	7
96	5	8
95	6	9
93 à 94	7 à 8	10
91 à 92	9 à 10	11
89 à 90	11 à 12	12
87 à 88	13 à 14	13
84 à 86	15 à 17	14
81 à 83	18 à 20	15
78 à 80	21 à 23	16
73 à 77	24 à 28	17
67 à 72	29 à 34	18
56 à 66	35 à 45	19
51 à 55	46 à 50	20

[a]Ce tableau indique la variation maximale acceptable, c'est-à-dire la différence entre les valeurs limites du taux de germination, entre les doubles, en tenant compte d'une variation uniquement due à l'échantillonnage aléatoire avec une probabilité de 0,025. Pour déterminer la variation maximale acceptable, calculer le taux moyen des quatre doubles, en arrondissant au nombre entier le plus proche. Au besoin, former des doubles de 100 graines en réunissant des sous-groupes de 50 ou 25 graines qui ont été placés dans la même partie germoir. La différence maximale acceptable est la valeur indiquée en regard du taux qu'on retrouve dans la première ou la deuxième colonne.

l'épreuve, avec la même méthode ou avec une méthode différente, lorsque :

a) la différence entre les valeurs limites obtenues pour les doubles de 100 graines dépasse la valeur maximale acceptable prescrite au tableau 3;

b) la qualité des résultats est douteuse parce que les conditions dans lesquelles l'épreuve a été réalisée n'étaient pas adéquates, qu'il y a eu des erreurs dans l'évaluation des plantules, dans les comptages ou l'enregistrement des résultats;

c) la qualité des résultats est douteuse parce que des graines étaient en dormance, qu'on a décelé des signes de phytotoxicité ou que des champignons ou des bactéries se sont propagés durant l'épreuve.

Dans le cas décrit en a), si les résultats de la deuxième épreuve sont compatibles avec ceux de la première, c'est la moyenne de ces valeurs qu'on déclare comme taux de germination moyen, à condition que la différence entre les deux séries de résultats ne dépasse pas la valeur acceptable prescrite au tableau 4. Si l'écart est supérieur à la valeur acceptable, il faut faire au moins une autre épreuve.

Dans le cas décrit en b), il faut reprendre l'épreuve suivant la même méthode et en donner les résultats dans le rapport.

Dans le cas décrit en c), on reprend l'épreuve suivant l'une des autres méthodes possibles mentionnées au tableau 2 ou on se sert de sable ou de terre comme substrat. On donne dans le rapport les résultats les plus satisfaisants en indiquant quelle méthode a été employée.

Tableau 4. Compatibilité des résultats de plusieurs épreuves

Si le taux de germination moyen vaut ou	*La différence[a] maximale acceptable entre les résultats vaut :*
98 à 99	2 à 3	2
95 à 97	4 à 6	3
91 à 94	7 à 10	4
85 à 90	11 à 16	5
77 à 84	17 à 24	6
60 à 76	25 à 41	7
51 à 59	42 à 50	8

[a]Ce tableau indique la différence maximale acceptable d'après laquelle on détermine si les résultats de deux épreuves sont compatibles, en tenant compte d'une variation uniquement due à l'échantillonnage aléatoire avec une probabilité de 0,025. Pour déterminer si les résultats de deux épreuves sont compatibles, calculer le taux de germination moyen, en arrondissant au nombre entier le plus proche, et trouver la valeur correspondante dans la première ou la deuxième colonne. Les résultats sont compatibles lorsque la différence entre les taux de germination des deux épreuves ne dépasse pas la valeur acceptable indiquée dans la troisième colonne.

5.10. Résultats figurant au rapport

Les valeurs obtenues s'expriment en pourcentage par rapport au nombre de graines évaluées. Lorsque les valeurs obtenues pour quatre doubles de 100 graines sont acceptables suivant les indications du tableau 3, la moyenne de ces valeurs, arrondie au nombre entier le plus proche, est le taux inscrit dans le rapport. Il faut donner tous les résultats de l'épreuve de germination, c'est-à-dire indiquer les proportions de plantules normales, de plantules anormales, de graines dures, de graines fraîches non germées et de graines mortes. Si, dans l'autre de ces catégories, la proportion est nulle, on l'indique par le symble «—0—». Il faut aussi indiquer la durée de l'épreuve; si celle-ci s'est prolongée au-delà de la période parce que certaines graines commençaient juste à germer à la fin, il faut donner séparément les résultats obtenus au terme du délai prescrit. Si l'on prescrit des épreuves en double (section 5.7.4(iii) et tableau 2), il faut donner les résultats des deux.

Si l'on reprend une épreuve parce que les résultats obtenus pour un double de 100 graines ne sont pas acceptables suivant les indications du tableau 4, on inscrit au rapport la moyenne des résultats des deux épreuves, pourvu que ceux de la deuxième soient compatibles avec ceux de la première (c'est-à-dire que la différence entre les moyennes ne dépasse pas la valeur acceptable indiquée au tableau 4). Si les résultats de la deuxième épreuve sont incompatibles avec ceux de la première, il faut reprendre l'épreuve une troisième fois, suivant la même méthode. On inscrit au rapport la moyenne des résultats compatibles. Lorsqu'on reprend une épreuve, il faut le noter dans le rapport, expliquer pourquoi et signaler que les proportions inscrites représentent la moyenne des résultats de plusieurs épreuves.

Lorsqu'on s'est servi d'une des autres méthodes mentionnées avec les conditions prescrites (substrats ou température différents) ou qu'on a refroidi les graines au préalable pour interrompre la dormance, il faut décrire la méthode employée. Si l'on a déterminé la proportion de graines viables à la fin d'une épreuve (section 5.8), il faut donner le résultat obtenu et indiquer quelles méthodes on a suivies. Enfin, si l'on a déterminé les proportions de graines vaines et de graines attaquées par des insectes, il faut aussi indiquer quelle méthode on a employé.

6. *Détermination de la teneur en humidité*

6.1 But et définition

Il s'agit de déterminer la teneur en humidité de l'échantillon, c'est-à-dire la quantité d'eau que perdent les graines lorsqu'on les déshydrate par l'une des méthodes décrites ci-après. La teneur en humidité s'exprime en pourcentage par rapport au poids de l'échantillon original.

6.2 Principes généraux

Les méthodes décrites ci-après ont été conçues de façon que l'oxydation, la décomposition ou l'évaporation d'autres substances volatiles que l'eau soient limitées le plus possible et que la quantité d'eau évaporée soit la plus grande possible. L'échantillon d'analyse (section 2.5.5) doit être envoyé au laboratoire dans un contenant étanche, hermétique et intact dont on aura expulsé autant d'air que possible (section 2.6). L'analyse doit commencer dès que c'est possible, et il faut éviter que l'échantillon ne soit exposé à l'air dans le laboratoire. S'il n'est pas nécessaire de moudre les graines, il ne doit pas s'écouler plus de deux minutes entre le moment où on sort l'échantillon du contenant dans lequel il est arrivé et celui où on place l'échantillon de travail dans le contenant de déshydratation.

6.2.1 Pesée

Il faut peser au milligramme près les échantillons devant servir à la mesure de la teneur en humditié.

6.2.2 Appareils

Selon la méthode employée, on aura besoin de certains des appareils suivants:

a) Broyeur ajustable fait de matériaux non absorbants. Il doit être conçu de telle façon que les graines à broyer et le produit broyé soient exposés le moins possible à l'air ambiant durant l'opération. Il doit donner une mouture uniforme à une vitesse où le produit à broyer n'est pas chauffé et permettre de limiter la circulation de l'air, sinon il peut s'évaporer de l'eau. Il doit être ajustable de façon qu'on puisse obtenir des particules filtrables sur un tamis à mailles de 4 mm (section 6.2.4).

b) Four à température constante, avec contenants de déshydratation, et dessiccateur. Il faut un four à convection naturelle ou forcée, chauffé à l'électricité, avec thermostat, bien isolé, dans lequel la température est raisonnablement uniforme et atteint le degré prescrit au voisinage des étagères. Il doit comporter des étagères amovibles perforées ou faites en broche, ainsi qu'un thermomètre dont la précision (plus ou moins 0,5°) est avérée, installé près de l'étagère du haut, à proximité des échantillons. Sa capacité de chauffage doit être telle que lorsqu'on le préchauffe à la température prescrite et qu'on l'ouvre pour y placer les échantillons, la température revient au degré voulu en 15 minutes au plus.

Les contenants sont faits d'un métal résistant à la corrosion ou de verre et se ferment hermétiquement afin que l'hydratation ou l'évaporation d'eau soient limitées le plus possible; les parois mesurent environ 0,5 mm d'épaisseur, le fond est plat, les côtés sont arrondis dans le bas et forment dans le haut une bordure égale. Le contenant et son couvercle doivent porter le même numéro. Avant de se servir des contenants, il faut les faire sécher une heure à 130° C et les laisser refroidir au dessiccateur (ou suivre une méthode équivalente). La surface effective du contenant doit être telle que la teneur en humidité de l'échantillon ne dépasse nulle part 0,3 g/cm^2.

Le dessiccateur doit permettre de refroidir rapidement les contenants avec le dessiccatif approprié (par exemple du pentoxyde de phosphore ou de l'alumine activée).

c) Une balance analytique permettant une pesée rapide au 0,001 g près.

d) Un tamis de broche à mailles de 4 mm.

6.2.3 Échantillon de travail

La teneur en humidité se détermine en double au moyen de deux échantillons de travail de 4 à 5 g prélevés séparément. On doit d'abord bien mélanger l'échantillon d'analyse, puis prélever les échantillons de travail suivant l'une des méthodes décrites à la section 3.4.2. Les échantillons ne doivent pas être exposés à l'air ambiant plus de 30 secondes.

6.2.4 Broyage

Il faut broyer les graines volumineuses comme celles de *Quercus* spp. avant de les faire sécher. On broie d'abord un sous-échantillon, puis on en tire l'échantillon de travail. Au moins 50 % du produit broyé doit être filtrable sur un tamis à mailles de 4 mm.

On ajuste le broyeur de façon à obtenir des particules de 4 mm; on broie d'abord une petite partie de l'échantillon et on la rejette. On broie ensuite un peu plus de graines que ce dont on a besoin pour l'épreuve.

Tableau 5. Différence acceptable entre les résultats de deux mesures de la teneur en humidité

Grosseur des graines	*Catégorie de semences (quantité de semences pures/kg)*	*Teneur en humidité initiale (%)*	*Différence acceptable (%)*
Petites	>5000	<12	0,3
Petites	>5000	>12	0,5
Grosses	<5000	<12	0,4
Grosses	<5000	12 à 25	0,8
Grosses	<5000	>25	2,5

6.3 Méthode

Peser le contenant vide et son couvercle. Verser l'échantillon de travail, prélevé suivant la méthode décrite dans la section 3.4.2, en le distribuant uniformément dans le contenant. Peser de nouveau le contenant et son couvercle, puis placer le tout immédiatement, le couvercle en dessous, dans un four chauffé à 103 ± 2° C; laisser sécher à cette température 17 ± 1 heures. Le séchage commence lorsque la température est revenue au degré voulu. À la fin de la période prescrite, fermer le contenant et le mettre à refroidir au dessiccateur au moins 30 à 45 minutes. Après ce refroidissement, peser le tout de nouveau.

6.4 Calculs et présentation des résultats

La teneur en humidité, qui s'exprime en pourcentage par rapport au poids, se calcule à une décimale près par la formule suivante :

$$(M_2 - M_3) \times \frac{100}{M_2 - M_1}$$

où M_1 = poids (en grammes) du contenant et de son couvercle; M_2 = poids du contenant, de son couvercle et de l'échantillon avant le séchage; et M_3 = poids du contenant, de son couvercle et de l'échantillon après le séchage. La différence $M_2 - M_1$ représente le poids de l'échantillon avant le séchage, c'est-à-dire le poids à l'état frais. La teneur en eau s'exprime toujours en fonction du poids à l'état frais.

La teneur en humidité de l'échantillon, exprimée en pourcentage, correspond à la moyenne des résultats obtenus pour chacun des doubles, pourvu que la différence entre ces résultats ne dépasse pas 0,3 à 2,5 %, tout dépendant de la grosseur des graines et de leur teneur initiale en eau. Les limites acceptables sont indiquées au tableau 5. Si la différence entre les résultats dépasse la limite acceptable, il faut reprendre l'épreuve, en double. On arrondit la valeur de la teneur en eau au 0,1 % le plus proche.

7. *Évaluation de la viabilité par voie biochimique*

7.1 But

Avec l'épreuve biochimique, on veut estimer rapidement la viabilité d'un échantillon de graines d'après la coloration que prennent les tissus des graines lorsqu'on plonge celles-ci dans un réactif au tétrazolium. Cette épreuve est particulièrement utile lorsqu'il faut évaluer des graines en dormance profonde pour lesquelles l'épreuve de germination prendrait normalement plus de deux mois. On s'en sert aussi pour déterminer la viabilité des graines qui n'ont pas germé à la fin d'une épreuve de germination.

7.2 Définitions

Graines viables :
graines qui peuvent produire une plantule dans une épreuve de germination après qu'on les a traitées pour interrompre la dormance ou, si elles sont malades, après qu'on les a désinfectées. Les tissus de ces graines se colorent complètement ou, si la coloration est partielle, elle remplit les critères par lesquels on définit les graines viables au tableau 6.

Graines non viables :
graines qui ne peuvent produire de plantule. Les tissus de ces graines ne se colorent pas de façon caractéristique ou certains éléments essentiels sont mous. Les graines chez lesquelles l'embryon ou d'autres éléments essentiels ne se développent pas normalement sont considérées non viables, qu'elles se colorent ou non. Dans le cas des graines de conifères, celles dont l'embryon mesure moins de la moitié de la longueur de la cavité endospermique sont considérées non viables.

Éléments essentiels :
il s'agit des méristèmes et de tous les éléments nécessaires au développement d'une plantule normale. Lorsque l'embryon et l'endosperme sont bien développés et bien différenciés, les petites zones de nécrose peuvent guérir. Les zones de nécrose superficielle, peu étendues, sont donc acceptables, même lorsqu'elles se trouvent dans des tissus essentiels.

7.3 Principes généraux

Pour mettre en évidence les processus de réduction qui s'opèrent dans les cellules, on se sert d'une solution de chlorure ou de bromure de 2,3,5-triphényltétrazolium, un indicateur jaune pâle. Lorsque ce produit est absorbé dans les tissus, il est réduit, c'est-à-dire qu'il accepte l'hydrogène libéré sous l'action des déshydrogénases, et se transforme en triphénylformazan, composé stable qui ne se diffuse pas et qui colore les tissus en rouge. Cette coloration permet de distinguer les tissus vivants (rouges) des zones nécrosées. C'est ce qu'on appelle une «épreuve de coloration topographique».

Certaines graines se colorent en entier, d'autres ne se colorent pas du tout. La coloration peut aussi être partielle, mettant en évidence la présence de zones de nécrose. Lorsqu'on en trouve dans les tissus de l'embryon ou de l'endosperme (ou du gamétophyte), c'est essentiellement d'après leur étendue et leur emplacement qu'on détermine si la graine est viable ou non. L'intensité de la coloration n'a qu'une importance secondaire, mais elle peut servir, de même que la consistance des tissus, à repérer les zones de tissus sains, de tissus faibles ou de tissus nécrosés.

7.4 Matériel

On emploie une solution aqueuse de chlorure ou de bromure de tétrazolium à 1,0 % dont le pH varie de 6,5 à 7,5. Il faut la tamponner s'il est impossible d'obtenir ce pH à cause de l'eau distillée utilisée.

La solution tampon se prépare comme suit : dissoudre 9,078 g de KH_2PO_4 dans 1 000 mL d'eau distillée, puis dissoudre 9,472 g de NaH_2PO_4 ou 11,876 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, également dans 1 000 mL d'eau distillée. Mélanger deux portions de la solution de KH_2PO_4 avec trois portions de la solution de Na_2HPO_4 (ou de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$). Pour produire du réactif à 1,0 %, dissoudre 1 g de sel de tétrazolium dans 100 mL de cette solution tampon.

7.5 Méthode

7.5.1 Échantillon de travail

Lorsqu'on fait une épreuve biochimique au lieu d'une épreuve de germination, il faut prélever, comme pour cette dernière, quatre doubles (section 5.6) dans la fraction de semences pures (section 3.2). On peut aussi faire cette épreuve pour évaluer les graines qui n'ont pas germé à la fin d'une épreuve de germination.

7.5.2 Préparation des graines

Il faut préparer les graines de façon à faciliter la pénétration de la solution de tétrazolium dans leurs tissus. Pour ce faire, on procède comme suit :

i) Laisser tremper les graines dans l'eau de 18 à 24 heures à la température ambiante. Égoutter.

ii) Le fait d'exposer les tissus facilite la pénétration de la solution de tétrazolium et l'évaluation de la coloration. À cette fin, on incise longitudinalement l'endo-

Tableau 6. Méthodes d'évaluation des semences forestières par l'épreuve au tétrazolium

Espèce	*Hydratation*		*Exposition des tissus*	*Durée de la coloration*[c] *(h)*	*Préparation pour l'évaluation*	*Étendue maximale des zones de tissus non colorés, mous ou nécrosés*[d]	*Remarques*
	Méthode[a]	*Durée*[b] *(h)*					
Abies, Larix, Picea, Pinus, Pseudotsuga, Taxus, Tsuga spp.	W	18 à 24	1. Couper les deux extrémités transversalement et enlever les fragments d'endosperme. 2. Couper la graine longitudinalement, sans entamer l'embryon.	8 à 24 sauf dans le cas de *Taxus*: 24 à 48	1. Inciser l'endosperme longitudinalement pour exposer l'embryon. Enlever le tégument 2. Inciser l'embryon longitudinalement	Nulle, y compris dans les tissus de l'endosperme	Si les graines sont vieilles et déshydratées, on peut obtenir de meilleurs résultats en les faisant tremper 48 heures; l'emploi d'un fongicide peut faciliter l'évaluation; les embryons qui mesurent moins de la moitié de la cavité embryonnaire ne sont pas viables.
Acer rubrum	1. W	18 à 24	1. Enlever le tégument	15 à 20		Pointe de la radicule, ¼ de la région distale des cotylédons; s'il s'agit de nécrose superficielle la graine est acceptable, même si la moitié des cotylédons est atteinte	
	2. S	Refroidissement préalable de 10 à 14 jours à 3 à 5° C	2. Enlever le péricarpe et le tégument				Il est préférable de refroidir au préalable les graines vieilles et déshydratées.
Chamaecyparis nootkatensis	W	18 à 24	1. Couper transversalement le quart de la région distale 2. Inciser longitudinalement, sans entamer l'embryon.	24	Inciser l'embryon longitudinalement et enlever le tégument	Nulle, y compris dans les tissus de l'endosperme	
Fraxinus spp.		Enlever le péricarpe et l'aile	Inciser les deux bordures sur environ 0,5 mm	16 à 24	Couper l'endosperme en deux pour exposer l'embryon	Nulle, sauf de petites zones de nécrose sur l'endosperme en des points éloignés de l'embryon	
	W	18 à 24					

[a] Hydratation dans l'eau (W) ou dans du sable humidifié (S).
[b] À la température ambiante (20 à 25° C).
[c] À 30° C, solution concentrée à 1 %.
[d] Comme l'évaluation porte sur la graine entière, si l'on en enlève une portion pour la coloration, il faut compter celle-ci comme si elle était complètement colorée ou comme si elle faisait partie de la surface non colorée acceptable.

sperme des graines de conifères, en coupant parallèlement à l'embryon, sans entamer ce dernier, ou on coupe la graine transversalement aux deux extrémités, juste assez pour ouvrir le tégument sans trop endommager l'embryon. Pour exposer les tissus des graines des essences feuillues, on enlève le péricarpe et on excise une partie de la bordure, tel qu'indiqué au tableau 6.

Lorsqu'on évalue la viabilité de graines fraîches à la fin d'une épreuve de germination, cette préparation est inutile, car les graines sont alors complètement hydratées et on les a déjà incisées longitudinalement pour en examiner l'intérieur (section 5.8). On peut placer ces graines telles quelles dans le réactif au tétrazolium.

7.5.3 Coloration

Plonger les graines dans la solution de tétrazolium en les immergeant complètement et laisser le tout à l'obscurité durant la période prescrite au tableau 6. L'obscurité est nécessaire car la lumière provoque la réduction de la solution de tétrazolium, que les graines soient viables ou non.

Lorsque les tissus ne se colorent pas complètement, on peut prolonger le traitement pour voir si cet effet est dû à la lenteur de l'absorption du réactif plutôt qu'à des anomalies inhérentes à la graine. Il faut éviter de trop colorer les graines, car les colorations différencielles auxquelles on reconnaît les graines faibles ou les lésions causées par le gel ou d'autres facteurs peuvent alors n'être plus visibles.

À la fin de la coloration, retirer les graines du réactif et rincer deux ou trois fois à l'eau distillée.

7.5.4 Préparation pour l'évaluation

Pour que l'évaluation soit valable, il peut être nécessaire d'apprêter encore les graines, suivant les indications du tableau 6, tout dépendant de la façon dont on a exposé les tissus avant la coloration. Dans cette deuxième préparation, on sépare l'embryon de l'endosperme. Dans la plupart des cas, lorsqu'on examine les graines fraîches à la fin d'une épreuve de germination, il n'est pas nécessaire d'apprêter celles-ci davantage, car leurs éléments se séparent facilement.

7.5.5 Évaluation

Il faut examiner toutes les graines de l'échantillon et déterminer si elles sont viables ou non en fonction de la coloration et de l'état des tissus. Seules les graines complètement colorées, ou celles qui présentent des zones non colorées jugées acceptables, sont considérées viables. Une graine dont les éléments essentiels sont mous est considérée non viable, même si elle est complètement colorée.

On donne des instructions sur l'évaluation au tableau 6.

Il faut noter que les régions incisées ne se colorent pas tellement bien : elles prennent plutôt une teinte argentée foncée. Il ne faut donc évaluer que les régions non incisées des tissus de l'embryon et de l'endosperme. Cette restriction est particulièrement importante si l'on évalue des graines fraîches à la fin d'une épreuve de germination, puisque leur embryon aura peut-être été incisé.

7.6 Calculs et présentation des résultats

On dénombre les graines viables dans chaque double (section 7.4.1), puis on détermine la proportion moyenne pour tous les doubles en arrondissant au nombre entier le plus proche. Si la différence entre les valeurs limites obtenues pour un double de 100 graines dépasse la valeur maximale prescrite au tableau 3, les résultats de l'épreuve sont considérés non satisfaisants.

7.7 Résultats figurant au rapport

Les résultats se présentent comme suit :

Épreuve au tétrazolium :
. . . % des graines sont viables.

On peut aussi déterminer les proportions de graines vaines, de graines renfermant des larves d'insectes, de graines brisées ou pourries; c'est le laboratoire de contrôle qui en décide. Si l'on évalue des graines à la fin d'une épreuve de germination, il faut présenter les résultats suivant les indications données à la section 5.10.

Remerciements

Nous voudrions remercier ici M. B.S.P. Wang (Service canadien des forêts, Institut forestier national de Petawawa) pour ses conseils et M. D.W. Taylor (Service canadien des forêts, Centre de foresterie du Pacifique) pour l'aide qu'il nous a apportée sur le plan technique.